

Meiner Familie

Einsatz funktioneller Antikörper zur Detektion und
Hemmung des malignitätsassoziierten Rezeptors für
Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) bei akuter
lymphatischer Leukämie der B-Zellen (B-ALL)

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Tina Vetter
geboren am 28.08.1988 in Jena

Gutachter

1. Prof. Dr. Karlheinz Friedrich, Jena
2. Prof. Dr. Paul La Rosée, Jena
3. Prof. Dr. Dieter Kube, Göttingen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.03.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Einführung - die Bedeutung von TSLP und seines Rezeptors	3
2.2 Die Rolle von TSLP bei Immunprozessen	5
2.3 Leukämie - die Bedeutung des hTSLP-Rezeptors bei der B-ALL	6
2.3.1 Pathophysiologie und Epidemiologie der Leukämie	6
2.3.2 Risikofaktoren und typische genetische Aberrationen bei der ALL .	7
2.3.3 Genetische Aberrationen der B-ALL mit einer Überexpression des hTSLP-Rezeptors	9
2.4 Antikörper und ihre Bedeutung in der Diagnostik und Therapie	13
3 Ziele der Arbeit	19
4 Material und Methoden	20
4.1 Material	20
4.1.1 Zellen	20
4.1.2 Zellkulturmedien	22
4.1.3 Puffer und Lösungen	23
4.1.4 Chemikalien	25
4.1.5 Kits	26
4.1.6 Zytokine	26
4.1.7 Analytische und inhibitorische Antikörper	27
4.1.8 Verbrauchsmaterialien	29
4.1.9 Geräte	30
4.2 Zellbiologische Methoden	30
4.2.1 Zellkultur	30
4.2.2 Bestimmung der Zellzahl	30
4.2.3 Einfrieren und Auftauen von Kryokonserven	31
4.2.4 Starvieren von Zellen	31
4.2.5 Transiente Transfektion	31
4.2.6 Subklonierung von polyklonalen Hybridomakulturen	32
4.2.7 Präparation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	32

4.2.8	Zellproliferationsassay	33
4.2.9	Zytotoxizitätstest	33
4.2.10	Luciferase-Reportergenassay	34
4.2.11	Statistische Berechnungen	34
4.3	Durchflusszytometrische Methoden	35
4.3.1	Zellinkubation mit Antikörpern	35
4.3.2	Einstellung der Parameter am Durchflusszytometer	35
4.3.3	Auswertung zytometrischer Daten	36
4.4	Proteinbiochemische Methoden	36
4.4.1	Zellstimulation für die STAT-Tyrosinphosphorylierung	36
4.4.2	Herstellung von Zelllysaten	37
4.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford	37
4.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	37
4.4.5	Western-Blot	38
4.4.6	Dot-Blot	39
4.4.7	ELISA	39
4.4.8	Gewinnung und chromatographische Reinigung von Antikörpern aus Hybridoma-Überständen	40
4.4.9	Konzentrierung von Antikörpern mittels Protein A-Sepharose-Beads	41
4.4.10	FITC-Konjugation monoklonaler Antikörper	41
5	Ergebnisse	42
5.1	Vorarbeiten und Voraussetzungen für die Gewinnung monoklonaler anti- hTSLPR-Antikörper	42
5.2	Identifizierung hTSLP-Rezeptor-bindender und -inhibierender Antikörper .	45
5.2.1	Standardverfahren der zytometrischen Analyse	45
5.2.2	Zytometrische Durchmusterung von Antikörpern aus Hybridoma- Kulturüberständen	46
5.2.3	Vorversuche zur Spezifitätskontrolle zum Ausschluss P5D4-bindender Antikörper	48
5.2.4	Identifizierung von Antikörpern mit Bindung an denaturiertes hTSLP-Rezeptorprotein	50
5.2.5	Identifizierung von anti-hTSLPR-Antikörpern mit inhibitorischen Eigenschaften	52
5.2.6	Resümee	54
5.3	Charakterisierung der anti-hTSLPR-Antikörper	54
5.3.1	Expansion und Reinigung identifizierter anti-hTSLPR- Antikörper .	54

5.3.2	Spezifitätstests mittels ELISA	55
5.3.3	Vergleich von anti-hTSLPR-Antikörpern in der Durchflusszytometrie	56
5.3.4	Charakterisierung gereinigter anti-hTSLPR-Antikörper im Western- Blot	57
5.3.5	Charakterisierung inhibierender anti-hTSLPR-Antikörper	58
5.4	Anwendung funktioneller anti-hTSLPR-Antikörper zur Analyse humaner Blutzellen	62
5.4.1	Untersuchung humaner Monozyten und B-Lymphozyten auf eine hTSLPR-Expression	62
5.4.2	Untersuchung von humanen B-ALL-Zelllinien auf eine hTSLPR- Expression	65
5.4.3	Vorversuche zum Einsatz von hTSLPR-Antagonisten an humanen B-ALL-Zelllinien	67
6	Diskussion	71
7	Schlussfolgerungen	83
	Literaturverzeichnis	84
	Anhang	i

1 Zusammenfassung

Zytokine sind Mediatoren immunologischer Prozesse und für die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen von zentraler Bedeutung. Durch die Bindung an ihre entsprechenden Zytokin-Rezeptoren werden Signale in den Zellkern geleitet, was häufig über Januskinasen und sogenannte *Signal transducers and activators of transcription* (STATs) erfolgt. *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) ist ein Typ I Zytokin, welches erstmals aus dem konditionierten Medium einer murinen Thymus-Stroma-Zelllinie isoliert wurde. Es fördert sowohl im humanen als auch im murinen Organismus die B-Lymphopoese und entfaltet daher auch einige ähnliche Wirkungen wie das Interleukin-7 (IL-7). Der heterodimere Rezeptor für TSLP (TSLPR) setzt sich aus der TSLPR α -Kette und der IL-7R α -Kette zusammen.

Vor einigen Jahren wurde bekannt, dass TSLP und seinem Rezeptor eine Bedeutung bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen, wie Asthma bronchiale und der atopischen Dermatitis, zukommt. Aktuelle Daten zeigen außerdem, dass TSLP und der TSLP-Rezeptor womöglich eine Rolle bei der Genese maligner Tumorerkrankungen spielen, wie beispielsweise bei Tumoren des Pankreas und bei Brustkrebs. Des Weiteren wurde der humane TSLP-Rezeptor in 15 % der Fälle von akuter lymphatischer Leukämie der B-Zellen (B-ALL) in überexprimierter Form vorgefunden und mit einer malignitätsrelevanten Funktion in Verbindung gebracht. Die Ursache für die Überexpression wird in verschiedenen genetischen Aberrationen vermutet. Eine verstärkte Expression des Rezeptors ist mit einem prognostisch ungünstigen Verlauf der Erkrankung assoziiert. In diesem Zusammenhang schien eine spezifische Hemmung des humanen TSLP-Rezeptors, ohne die Funktionen des Zytokins IL-7 zu beeinträchtigen, besonders attraktiv zu sein.

Das Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen die humane TSLPR α -Kette, welches mittels der Hybridomatechnik verfolgt wurde. Anhand einer murinen Zelllinie, die den humanen TSLP-Rezeptor stabil exprimiert (Ba/F3-hTSLPR), wurden durch zytometrische Analysen monoklonale anti-hTSLPR-Antikörper identifiziert, welche anschließend bezüglich ihrer Funktionalität durchgemustert wurden. Auf diese Weise konnten sowohl Antikörper zur Detektion des nativ exprimierten hTSLP-Rezeptors im Durchflusszytometer als auch zur Erkennung denaturierten hTSLP-Rezeptorproteins im Western-Blot gewonnen werden. Des Weiteren wurden mittels Reportergenassays, Proliferationsassays und Western-Blot-Analysen monoklonale anti-hTSLPR-Antikörper mit inhibitorischen Eigenschaften identifiziert, welche eine IC_{50} zwischen 0,4 – 0,6 μ M aufwiesen.

Durch den Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper konnte der natürlicher-

weise exprimierte hTSLP-Rezeptor auf der Zelloberfläche von Monozyten und B-Zellen zytometrisch nachgewiesen werden. Darüber hinaus gelang die zytometrische Detektion des Rezeptors bei zwei von zehn B-ALL-Zelllinien, wobei eine Linie eine ausgeprägte, die zweite nur eine schwache Expression des Rezeptors zeigte. Auf eine Stimulation mit hTSLP reagierte die stark hTSLPR⁺ B-ALL-Zelllinie mit einer Proliferationssteigerung um etwa 70 % und mit einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5. Um die durch hTSLP induzierten Effekte zu antagonisieren, wurden die Zellen vor ihrer Stimulation versuchsweise mit den inhibitorischen anti-hTSLPR-Antikörpern versetzt. Erste Versuche erwiesen, dass eine Blockierung des Rezeptors den hTSLP-abhängigen Proliferationseffekt zu unterdrücken vermochte. Darüber hinaus zeigte sich, dass die hTSLP induzierte STAT5-Tyrosinphosphorylierung durch den Einsatz von hTSLPR-Antagonisten gehemmt werden konnte. Die Beeinflussung der Signaltransduktion von hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen durch hTSLPR-Antagonisten gilt es in Folgearbeiten weiter zu präzisieren.

Mit der Verfügbarkeit von funktionellen anti-hTSLPR-Antikörpern eröffnen sich zahlreiche Forschungsperspektiven bei der Untersuchung von Erkrankungen, bei welchen das humane TSLP und der hTSLP-Rezeptor eine Rolle spielen. Da die zielgerichtete Therapie bei Krebserkrankungen einen immer höheren Stellenwert einnimmt, wäre es denkbar, dass inhibitorische anti-hTSLPR-Antikörper in naher Zukunft bei hTSLPR-assoziierten Tumorentitäten als Therapieoption zum Einsatz kommen könnten.

2 Einleitung

2.1 Einführung - die Bedeutung von TSLP und seines Rezeptors

Zytokine sind Mediatoren, die durch die Bindung an ihren jeweiligen Rezeptor für die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von Zellen der Hämatopoese und von Immunzellen verantwortlich sind (Heim 1999). *Thymic Stromal Lymphopoietin* (TSLP) ist ein Typ I Zytokin, das erstmals im konditionierten Medium einer murinen Thymus-Stroma-Zelllinie isoliert wurde und *in vitro* aus Lymphozyten-Vorläuferzellen der B-Zelllinie NAG8/7 eine Differenzierung zu B220⁺/IgM⁺ B-Zellen hervorrief (Friend et al. 1994, Levin et al. 1999). TSLP ist speziesspezifisch und wurde unter anderem auch im humanen System identifiziert. Das humane TSLP entspricht dem murinen nur zu etwa 43 % (Quentmeier et al. 2001). Es wird von Immunzellen, aber auch von Epithelzellen der Haut und der Lunge produziert (He und Geha 2010). Das Zytokin fördert die B-Lymphopoese, indem es die Proliferation und B-Zell-Differenzierung aus fetalen hämatopoetischen Vorläuferzellen unterstützt (Vosshenrich et al. 2003, Scheeren et al. 2010). TSLP entfaltet somit ähnliche Wirkungen wie Interleukin-7 (IL-7), welches ebenfalls eine Reifung von B-Zellen bewirkt (Milne und Paige 2006). Die überlappenden Funktionen beider Zytokine sind vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass sich der TSLP-Rezeptor (TSLPR) und der IL-7-Rezeptor (IL-7R) die IL-7-Rezeptor α -Untereinheit (IL-7R α) teilen (Reche et al. 2001). Der TSLP-Rezeptor ist ein heterodimerer Typ I Zytokinrezeptor, welcher zur hämatopoetischen Rezeptor-Familie gehört (Park et al. 2000). Er wird von Immunzellen aber auch von Zellen verschiedener Organe, wie Herz, Niere, Leber und Skelettmuskel, exprimiert (Tonozyuka et al. 2001). Der Rezeptor setzt sich aus der TSLP-Rezeptor α -Kette (TSLPR α), welche auch als *Cytokine receptor-like factor 2* (CRLF2) bezeichnet wird, und der IL-7R α -Kette zusammen (Park et al. 2000). Der Rezeptorkomplex kann in eine extrazelluläre, eine transmembranöse und eine intrazelluläre Domäne unterteilt werden (siehe Abbildung 2.1) (Ito et al. 2012). Das Zytokin TSLP bindet zunächst an die niedrig affine extrazelluläre Domäne der TSLPR α -Kette, woraufhin diese mit der IL-7R α -Kette zu einem hochaffinen Rezeptorkomplex dimerisiert, dessen intrazelluläre Domäne die durch TSLP ausgelöste Signaltransduktion in den Zellkern vermittelt (siehe Abbildung 2.1) (Levin et al. 1999, Park et al. 2000, Mullighan et al. 2009). An der Signaltransduktion sind Transkriptionsfaktoren der Familie der *Signal transducers and activators of transcription* (STAT) beteiligt. STAT1, STAT3 und STAT5

werden durch die Januskinasen JAK1 und JAK2 phosphoryliert (Rochman et al. 2010, Wohlmann et al. 2010), woraufhin sie dimerisieren, in den Zellkern translozieren und dort eine transkriptionelle Aktivierung bestimmter Gene herbeiführen (Pellegrini und Dusanter-Fourt 1997, Kisseleva et al. 2002). TSLP und seinem Rezeptor wurden in den letzten Jahren sowohl bei der Entwicklung atopischer Erkrankungen, wie dem Asthma bronchiale und der atopischen Dermatitis (Ziegler 2010), als auch bei der Genese maligner Neoplasien eine Bedeutung beigemessen. Bei Tumoren des Pankreas wurden beispielsweise krebsassoziierte Fibroblasten mit der Fähigkeit zur Produktion von TSLP entdeckt. Das Zytokin ruft vermutlich innerhalb des Tumors eine Inflammation hervor, die durch T-Helferzellen 2 (TH2) getriggert wird und sich ungünstig auf das Überleben der Patienten auswirkt (De Monte et al. 2011). Des Weiteren könnte TSLP in einigen Fällen von Brustkrebs ein Schlüsselmediator für die Progression dieser Erkrankung sein (Olkhanud et al. 2011). Erst seit kurzem wird dem Rezeptor für TSLP in 15 % der Fälle von akuter lymphatischer Leukämie der B-Zellen (B-ALL) eine malignitätsrelevante Rolle zugeschrieben. Die Überexpression des Rezeptors scheint mit einem prognostisch ungünstigen Verlauf assoziiert zu sein (Yoda et al. 2010).

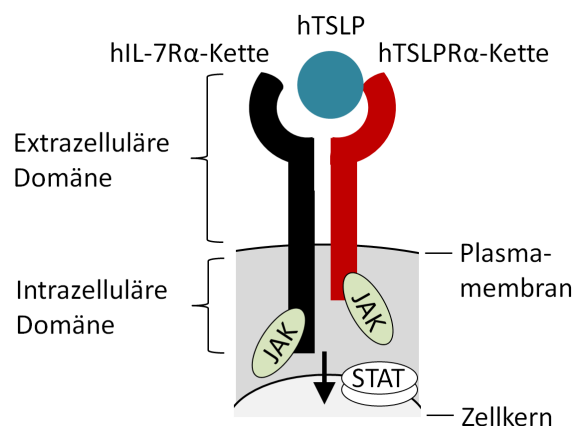


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau des humanen TSLP-Rezeptors

Der humane TSLP-Rezeptor setzt sich aus der hTSLPR α -Kette und der hIL-7 α -Kette zusammen. Das Zytokin hTSLP bindet an die extrazelluläre Domäne der hTSLPR α -Kette, woraufhin diese mit der hIL-7 α -Kette zu einem funktionellen hTSLP-Rezeptorkomplex (hTSLPR) dimerisiert. Durch die Stimulation des Rezeptors wird eine Signalkaskade ausgelöst, welche durch die intrazelluläre Domäne des Rezeptors über Januskinasen (JAK) und *Signal transducers and activators of transcription* (STAT) in den Zellkern vermittelt wird.

(modifiziert nach (Ito et al. 2012))

2.2 Die Rolle von TSLP bei Immunprozessen

Das Zytokin TSLP nimmt eine zentrale Bedeutung bei der Entwicklung allergischer, TH2-Zell getriggelter Erkrankungen ein (Ziegler 2010). In den letzten Jahren wurde vor allem die krankheitsrelevante Funktion von TSLP bei der Genese des allergischen Asthma bronchiale (Zhang et al. 2011), der atopischen Dermatitis (Yoo et al. 2005, He et al. 2008), der Keratokonjunktivitis (Matsuda et al. 2010), der eosinophilen Ösophagitis (Sherrill et al. 2010) und der atopischen Rhinitis (Miyata et al. 2008, Mou et al. 2009) untersucht. Scheinbar initiiert TSLP in Reaktion auf einen Kontakt mit Allergenen, Chemikalien oder Pathoorganismen besonders in Geweben mit einem Barrieredefekt eine inflammatorische Immunkaskade (Oyoshi et al. 2009, Demehri et al. 2009) und fördert die Differenzierung von TH2-Zellen aus naiven CD4⁺ T-Zellen (Ito et al. 2005). Es entfaltet seine Wirkung auf eine Vielzahl von Immunzellen. Beispielsweise ruft TSLP eine Aktivierung CD11⁺ dendritischer Zellen hervor und regt diese zu einer gesteigerten Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD54, CD80, CD83, CD86, MHCII (*Major histocompatibility complex II*), DC-lamp (*Dendritic cell lysosome-associated membrane protein*) und zur Bildung der Chemokine IL-8, Eotaxin-2, TARC (*Thymus and activation-regulated cytokine*) und MDC (*Macrophage-derived chemoattractant*) an, welche schließlich Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Mastzellen und TH2-Zellen an den Inflammationsort rekrutieren (Reche et al. 2001, Soumelis et al. 2002, Liu 2006, Demehri et al. 2009, He und Geha 2010, Kashyap et al. 2011). Ferner fördert TSLP die Expression des OX40-Liganden durch dendritische Zellen. Dieser gehört zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie und initiiert die T-Zell-Differenzierung zu TH2-Zellen (Liu 2006, Ito et al. 2012). In der Folge werden vermehrt Zytokine, wie IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und TNF α , ausgeschüttet (Soumelis et al. 2002). Des Weiteren regt TSLP die Produktion von IgE-Antikörpern durch B-Zellen an (Ito et al. 2012) und aktiviert CD14⁺ Monozyten bzw. Makrophagen, welche daraufhin verstärkt das Zelloberflächenantigen CD80 exprimieren und ihrerseits die Chemokine MDC, TARC und PARC (*Pulmonary and activation-regulated chemokine*) sezernieren (Reche et al. 2001, Hirano et al. 2011). Eine aberrante TSLP-Produktion konnte in den Epithelzellen der Lunge und in den Keratinozyten der Haut nachgewiesen werden (Ziegler 2010). Seit kurzem wird auch die Bildung von TSLP durch dendritische Zellen und Makrophagen postuliert (Kashyap et al. 2011). Da diese Zellen selbst auf TSLP reagieren, ist eine autokrine Aktivierung wahrscheinlich. Die Reagibilität der Immunzellen auf TSLP setzt die Expression seines Rezeptors voraus. Es gibt Hinweise, dass der TSLP-Rezeptor auf der Zelloberfläche von CD11⁺ dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen exprimiert wird (Reche et al. 2001, Kashyap et al. 2011).

2.3 Leukämie - die Bedeutung des hTSLP-Rezeptors bei der B-ALL

2.3.1 Pathophysiologie und Epidemiologie der Leukämie

Die Leukämie ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems und wird deshalb auch als Blutkrebs bezeichnet. Sie entsteht durch eine Entartung der Leukozyten, den weißen Zellen des hämatopoetischen Systems im Knochenmark. In den Zellen kommt es zu einer Störung des programmierten Zelltods und der natürlichen Tumorsuppression, was ein verändertes Proliferations- und Differenzierungsverhalten verursacht. Durch die klonale Expansion der Zellen im Knochenmark werden die normalen blutbildenden Zellen verdrängt. Dies führt zu einer Knochenmarksinsuffizienz und einer damit assoziierten Fehlfunktion (Feuring-Buske et al. 2002). Im weiteren Krankheitsverlauf gelangen unreife Zellen, welche auch als Blasten bezeichnet werden, ins Blut und infiltrieren extramedulläre Organe und das Zentralnervensystem. Symptome wie Adynamie, Knochenschmerzen, Kopfschmerzen, Lymphknoten-, Leber-, Milzschwellungen, Anämie, Infektanfälligkeit, Blutungsneigung und Petechien sind deshalb typisch (Senn et al. 2001). Leukämien werden in akute und chronische Formen unterteilt. Chronische Leukämien verlaufen eher schleichend und werden oft nur zufällig entdeckt. Die Zellen sind relativ ausgereift. Dem gegenüber entwickeln sich akute Formen innerhalb von Wochen und weisen einen progredienten Krankheitsverlauf mit schweren Symptomen auf. Die Blasten sind eher unreifzellig (Senn et al. 2001, Feuring-Buske et al. 2002, Herold 2010). Die Unterscheidung der Unterarten der Leukämie ist komplex. Sie hängt von den beteiligten Zelltypen und dem Immunphänotyp ab und ist in manchen Fällen nicht ganz eindeutig. Unbehandelt können Leukämien innerhalb kurzer Zeit zum Tod führen. Im Jahr 2010 verstarben etwa 3,3 % der Männer und 3,2 % der Frauen in Deutschland an Leukämien (Becker und Holzmeier 2010). Die akute lymphatische Leukämie (ALL) stellt mit einem Anteil von etwa 80 % die häufigste Form der Leukämie im Kindes- und Jugendalter dar (Herold 2010) und zählt mit einem Anteil von 30 % zu den häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter (Garbe et al. 2008). Sie tritt mit einer jährlichen Inzidenz von 3 – 4/100 000 im Alter < 15 Jahren im Verhältnis 1,2 : 1 (Jungen : Mädchen) auf, wobei sie vor allem Kinder zwischen zwei und fünf Jahren (Median 4,7 Jahre) betrifft (Garbe et al. 2008). Die Inzidenz steigt ab dem 55. Lebensjahr wieder an (Senn et al. 2001). Kinder mit Down-Syndrom weisen ein 10 – 20fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer ALL auf, bei der es sich meistens um Leukämien der B-Vorläuferzellen handelt (Zipursky et al. 1992, Russell et al. 2009). Die ALL wird bei

einem medullären Blastenanteil von $\geq 25\%$ bzw. bei einem Nachweis von Lymphoblasten im Blut diagnostiziert (Garbe et al. 2008). Sie lässt sich in verschiedene Unterformen einteilen, die sich sowohl in ihren zellulären und molekularen Eigenschaften, als auch hinsichtlich ihres Krankheitsverlaufes voneinander unterscheiden. Die ALL der B-Zellen wird in die Subtypen B-Vorläufer-Zell-ALL (Pro-B-ALL, Common-ALL, Prä-B-ALL) und B-ALL unterteilt, die ALL der T-Zellen in T-Vorläufer-Zell-ALL, frühe T-ALL (pro- und prä-T), intermediäre (kortikale) T-ALL und reife T-ALL. Leukämieformen wie die akute undifferenzierte Leukämie (AUL), die biphänotypische akute Leukämie (BAL) und biliniäre Leukämien stellen Sonderfälle dar (Garbe et al. 2008). Die Immunphänotypisierung, die Zytochemie, die morphologische Differenzierung nach der FAB-Klassifikation und die Analyse chromosomaler Veränderungen von Leukämiezellen mittels molekulargenetischer Methoden sind wegweisend für die Klassifikation, Therapiewahl und die Einschätzung der Prognose und des Rezidivrisikos (Garbe et al. 2008). Die Überlebensrate der ALL liegt bei etwa 80 %. Die risikoadaptierte Therapie erfolgt in der Kombination verschiedener Chemotherapieelemente, um durch frühe Therapieintensivierung eine Resistenzentwicklung zu vermeiden (Garbe et al. 2008). Das allgemeine Therapieprinzip umfasst dabei die intensive Induktion, die Konsolidierung und die Erhaltung der Remission. Weitere Therapiemöglichkeiten bestehen in einer Hochdosis-Chemotherapie mit nachfolgender Stammzelltransplantation und in einer Bestrahlung des Zentralnervensystems. Die Therapie bezweckt eine vollständige Elimination der im Körper befindlichen Leukämiezellen und die Wiederaufnahme der Knochenmarkfunktion (Senn et al. 2001, Garbe et al. 2008). 20 % der Erkrankten zeigen jedoch keinerlei Ansprechen auf die Therapie und haben insgesamt eine schlechte Prognose (Cario et al. 2010). Die Ergründung der Ursachen für das Versagen von Therapien und die Therapieoptimierung sind Gegenstand der derzeitigen Forschung.

2.3.2 Risikofaktoren und typische genetische Aberrationen bei der ALL

Die Ursachen für die Entwicklung einer Leukämie sind noch nicht vollständig erfasst. Der Krankheit liegen genetische Veränderungen zugrunde, die entweder spontan auftreten, durch angeborene Defekte bedingt sind, wie z.B. bei der Trisomie 21, oder durch äußere Einflüsse erworben werden. Dazu zählt ionisierende Strahlung beispielsweise im Zuge von Radiotherapien bei Tumorerkrankungen oder generell nach Strahlenexposition. Dabei kommt es in den Zellen zu erheblichen Schäden der DNA und ihren Reparatursystemen, die unter anderem im hämatopoetischen System tiefgreifende Störungen hervorrufen können. Beispielsweise traten nach den Atombombenabwürfen in Hiroshima und Nagasaki im hohen

Maße akute Leukämien auf (Hsu et al. 2013). Weitere äußere Einflüsse sind chemische Noxen, wie Benzol und seine Abkömmlinge, welche unter anderem im Zigarettenrauch vorkommen, oder alkylierende Chemotherapeutika (Senn et al. 2001). Besonders häufige Genaberrationen bei akuten lymphatischen Leukämien stellen chromosomale Anomalien dar. Diese umfassen unter anderem Translokationen, welche durch die Verlagerung von DNA zwischen Chromosomen definiert sind. Die dabei resultierenden chimären Fusionsgene codieren für Fusionsproteine, welche vermutlich die Differenzierung leukämischer Zellen blockieren (Greaves 2002). Das bekannteste Fusionsgen ist *bcr-abl* im sogenannten *Philadelphia* (Ph)-Chromosom, welches durch die Translokation t(9;22) entsteht und für das BCR-ABL-Fusionsprotein, eine Tyrosinkinase, codiert. Das Fusionsgen wurde erstmals bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) entdeckt, wo es in über 90 % der Fälle vorkommt (Nowell 2007). Des Weiteren wurde die *bcr-abl*-Translokation bei etwa 20 – 30 % der ALL-Fälle nachgewiesen. Sie trägt zu der deutlich schlechteren Prognose dieser Patienten bei (Liu-Dumlao et al. 2012). Der Kinasehemmer Imatinib, welcher die Aktivität der Tyrosinkinase BCR-ABL hemmt, dient als selektiver Inhibitor zur Behandlung von Patienten mit Ph⁺-ALL bzw. Ph⁺-CML (Kurzrock et al. 2003, Liu-Dumlao et al. 2012). Eine weitere häufige Translokation, die bei etwa 25 % der ALL im Kindesalter nachgewiesen wird, ist t(12;21) (*etv6-runx1/tel-aml1*). Sie ist prognostisch günstig (Tiensiwakul 2004). Weitere typische ALL-assoziierte Translokationen sind t(1;19), t(11;19), t(4;11) und t(8;14) mit unterschiedlichen Prognosen. Des Weiteren können Leukämien einen veränderten Chromosomensatz aufweisen. Aneuploide ALLs mit hypodiploidem Chromosomensatz sind im Vergleich zu solchen mit hyperdiploidem scheinbar prognostisch günstiger (Senn et al. 2001, Garbe et al. 2008, Mullighan et al. 2009). In 25 – 50 % der Fälle liegt ein zusätzliches X-Chromosom vor. Die Trisomie oder Tetrasomie des Chromosoms 21 (Hsa21) (*human chromosome 21*) ist ebenfalls eine häufig vorkommende genetische Abweichung bei der ALL, die durch eine spontane somatische Mutation entsteht. Diese Aberration hat vermutlich eine funktionelle Bedeutung bei der Leukämogenese. Patienten mit Down-Syndrom haben beispielsweise ein um 10 – 20fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer ALL (Zipursky et al. 1992, Malinge et al. 2009). In etwa 1/3 der Fälle sind die sonst für die B-ALL typischen genetischen Aberrationen allerdings nicht nachweisbar (Yoda et al. 2010). Die in diesen Fällen zugrunde liegenden Veränderungen werden derzeit erforscht.

2.3.3 Genetische Aberrationen der B-ALL mit einer Überexpression des hTSLP-Rezeptors

Vor kurzem wurde entdeckt, dass der humane Rezeptor für hTSLP in etwa 15 % der B-ALL-Fälle, welche nicht die B-ALL-typischen Chromosomenaberrationen aufweisen, in überexprimierter Form vorliegt. Jedoch korreliert die Überexpression weder mit dem Geschlecht, noch dem Erkrankungsalter, noch der Anzahl weißer Blutzellen. Bei der Down-Syndrom-assoziierten ALL (DS-ALL) wurde ein Anteil von 55 – 62 % ermittelt, bei welchem eine gesteigerte Expression des hTSLP-Rezeptors vorlag (Mullighan et al. 2009, Yoda et al. 2010, Hertzberg et al. 2010, Cario et al. 2010). Die verstärkte Präsenz des Rezeptors wird mit einer Therapieresistenz, einem hohen Rezidivrisiko und einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Harvey et al. 2010). Das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben der Patienten mit stark ausgeprägter hTSLPR-Expression ist geringer als von Patienten mit schwächerer Expression, wie Yoda et al. (2010) durch einen Vergleich von 90 erwachsenen B-ALL-Patienten mit unterschiedlich starker Rezeptorexpression ab Diagnosezeitpunkt beobachten konnten (siehe Abbildung 2.2). Zusätzliche Mutationen im *Ikaros family zinc finger protein (ikzf1)*-Gen, eine *bcr-abl*-ähnliche Genexpression und die ethnische Zugehörigkeit, speziell die lateinamerikanische Ethnizität, erhöhen vermutlich

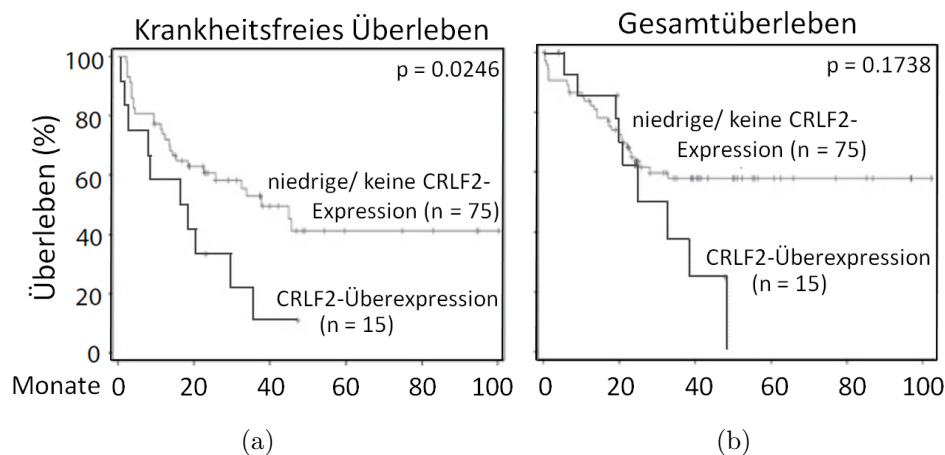


Abbildung 2.2: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse von B-ALL-Patienten mit unterschiedlich ausgeprägter hTSLPR-Expression

Vergleich des krankheitsfreien Überlebens (a) bzw. des Gesamtüberlebens (b) von Patienten mit einer B-ALL ab Diagnosezeitpunkt in Abhängigkeit der Expressionsstärke des hTSLP-Rezeptors (*Cytokine receptor-like factor 2 (CRLF2)*).

(modifiziert nach (Yoda et al. 2010))

das Rezidivrisiko (Harvey et al. 2010). Da die hTSLPR-Überexpression bei einem Großteil der DS-ALL-Fälle nachgewiesen wurde, an der malignen lymphoiden Transformation beteiligt zu sein scheint und offensichtlich hinsichtlich der Prognose eine wesentliche Rolle spielt, wurden die für die Überexpression zugrunde liegende Ätiologie und die Pathogenese in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen erforscht.

Genetische Abweichungen im CRLF2-Locus

Zunächst wurde der CRLF2-Locus, welcher in der pseudoautosomalen Region 1 (PAR1) auf dem kurzen Arm der Chromosomen X bzw. Y lokalisiert ist (siehe Abbildung 2.3), mithilfe molekularbiologischer und zytogenetischer Verfahren auf genetische Veränderungen untersucht. In einigen Fällen konnte eine Vervielfältigung des CRLF2-Locus nachgewiesen werden. Diese war teilweise auf eine Hyperdiploidie zurückzuführen, welche allerdings nicht zwangsläufig mit einer hTSLPR-Überexpression oder einem schlechten *Outcome* assoziiert war (Cario et al. 2010). Bei etwa 5 – 7 % der sporadisch aufgetretenen B-ALL und bei etwa 52 % der DS-ALL traten im CRLF2-Locus genetische Abweichungen auf (Russell et al. 2009, Harvey et al. 2010). Dabei handelte es sich entweder um eine intrachromosomale Deletion oder eine Translokation. Bei beiden Formen der Mutation unterliegt die CRLF2-Sequenz vermutlich einer modifizierten Transkriptionkontrolle, was in einer gesteigerten Expression der CRLF2-Kette und somit in einer ausgeprägten Expression des hTSLP-Rezeptors resultiert (Russell et al. 2009).

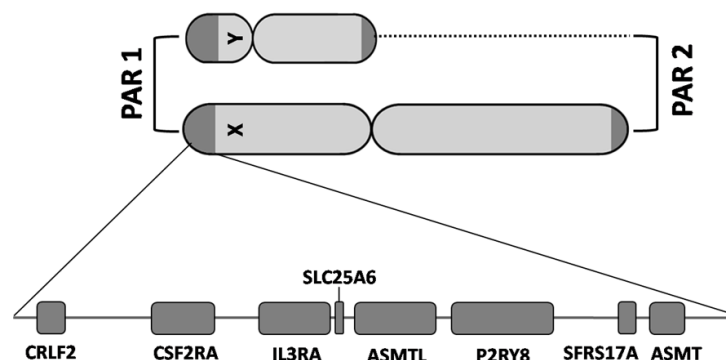


Abbildung 2.3: Genetische Umgebung des CRLF2-Locus

Der CRLF2-Locus befindet sich in der pseudoautosomalen Region 1 (PAR1) auf dem kurzen Arm der Geschlechtschromosomen X und Y.

(modifiziert nach (Flaquer et al. 2008, Russell et al. 2009))

Die intrachromosomale Deletion del(X)(p22.33p22.33) bzw. del(Y)(p11.32p11.32) in der Region PAR1 ist die Ursache der Fusion P2RY8-CRLF2, bei welcher das erste nicht-codierende Exon von P2RY8 (*purinergic receptor P2Y*) mit der codierenden Region von CRLF2 fusioniert ist. Von der Deletion sind mindestens drei Gene betroffen (P2RY8, SLC25A6, IL-3R α). Durch die Verlagerung der CRLF2-Sequenz in die unmittelbare Nähe des P2RY8-Promotors wird diese einer veränderten Transkriptionkontrolle unterworfen, wobei chimäre P2RY8-CRLF2 mRNA entsteht und eine hTSLPR-Überexpression zur Folge hat. Bei B-ALL-Zellen mit der nachgewiesenen Deletion wurde mittels *Real time* (RT)-PCR eine 5 – 100fach erhöhte mRNA-Menge und mithilfe der Durchflusszytometrie eine deutlich erhöhte Oberflächenexpression der hTSLPR-Kette festgestellt (Russell et al. 2009, Yoda et al. 2010, Cario et al. 2010). Ein ähnliches Fusionsgen, das chimäre P2RY8-SOX5-Gen, ist bei Lymphomen beschrieben. Hierbei resultiert die Fusion in einer Überexpression des Transkriptionsfaktors SOX5 (Storlazzi et al. 2007). Bei der B-ALL wird die P2RY8-CRLF2-Fusion lediglich in etwa 5 – 7 % der Fälle beobachtet. Dahingegen tritt sie bei über 55 % der Patienten mit DS-ALL auf, welche nicht die typischen chromosomalen Translokationen aufweisen. Daher scheint die P2RY8-CRLF2-Fusion bei der DS-ALL von funktioneller Bedeutung zu sein (Mullighan et al. 2009). Das Vorliegen der P2RY8-CRLF2-Fusion ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Das mediane Erkrankungsalter der Patienten liegt bei etwa 4 Jahren. Für die Entstehung der konservierten Bruchstellen wird eine abnorme Aktivität von Antigen-Rezeptor-Rekombinasen angenommen. Diese werden von *Recombinase activating genes* (RAG) codiert und spielen auch bei anderen Chromosomen-Mutationen der ALL eine Rolle (Marculescu et al. 2006, Mullighan et al. 2009). Der G-Protein gekoppelte Rezeptor P2RY8 gehört zur Familie der Purin-Rezeptoren, welche normalerweise in nahezu allen humanen Geweben in geringem Maße exprimiert werden. Da in manchen Leukämie-Fällen mit schlechter Prognose auch eine vermehrte Expression des P2RY8-Rezeptors entdeckt wurde, wird diesem ebenfalls ein onkogenes Potenzial und eine Rolle bei der Entstehung von akuten Leukämien zugeschrieben (Fujiwara et al. 2007). Inwieweit dem P2RY8-Rezeptor bei der genannten intrachromosomalen Deletion eine Bedeutung zukommt, ist noch unbekannt. Derzeit steht zur Diskussion, ob die P2RY8-CRLF2-Fusion als prognostischer Marker für die Zuordnung zu Hochrisikogruppen dienen könnte (Cario et al. 2010) oder ob diese Aberration allein als Risikofaktor bei Patienten mit einer B-ALL nicht ausreicht (Ensor et al. 2011).

Eine weitere Mutation der Region PAR1 stellt die IGH[@]-CRLF2-Translokation dar, bei welcher der CRLF2-Locus eines Geschlechtschromosoms und der IGH[@]-Locus (*Immunoglobulin heavy chain locus*) des Chromosoms 14 involviert sind. Durch die reziproke Translokation t(X;14)(p22;q32) bzw. t(Y;14)(p11;q32) gelangt der CRLF2-Locus in die

unmittelbare Nähe des IGH[®]-Enhancers, was in einer fehlregulierten Expression des hTSLP-Rezeptors resultiert. Patienten mit dieser Translokation weisen eine 80 – 1500fache mRNA-Menge und eine erhöhte Oberflächenexpression der hTSLPR-Kette auf. Als Ursache der strukturellen Chromosomen-Mutation wird eine veränderte V(D)J-Rekombination mit Beteiligung von Erkennungssequenzen innerhalb der pseudoautosomalen Region angenommen (Yoda et al. 2010). Eine ähnliche genetische Aberration ist beim follikulären Lymphom beschrieben, bei welchem der IGH[®]-Locus und das Gen *bcl2* (*B-cell lymphoma 2*) des Chromosoms 18 durch eine Translokation in die unmittelbare Nähe gelangen und in der Folge das antiapoptotische Protein BCL2 überexprimiert wird (Goodlad et al. 2006). Die Inzidenz der IGH[®]-CRLF2-Translokation bei der B-ALL beträgt zwischen 0,8 – 3 % und ist vor allem bei älteren Kindern und jungen Erwachsenen zu finden, wobei das mediane Erkrankungsalter bei 8 – 16 Jahren liegt. Die Patienten haben im Gegensatz zu denen mit der P2RY8-CRLF2-Fusion ein insgesamt schlechteres *Outcome*, da der IGH[®]-Enhancer die Transkription der hTSLPR-Kette vermutlich stärker begünstigt als der P2RY8-Promotor (Russell et al. 2009, Mullighan et al. 2009, Yoda et al. 2010, Harvey et al. 2010, Ensor et al. 2011).

Genetische Abweichungen der CRLF2-Sequenz

Darüber hinaus wurde bei 21,4 % der B-ALL-Patienten mit einer hTSLPR-Überexpression innerhalb der CRLF2-Sequenz die somatische Punktmutation Phe232Cys nachgewiesen. Die Mutation ist am Übergang der extrazellulären Domäne zur Transmembrandomäne der hTSLPR-Untereinheit lokalisiert. Aufgrund der Bildung intermolekularer Disulfid-Brücken durch Cystein kommt es zu einer Homodimerisierung zweier hTSLPR-Ketten mit dem Ergebnis einer permanenten zytokinunabhängigen Aktivierung der Signaltransduktion, beispielsweise in Form einer konstitutiven Phosphorylierung von STAT5. Demnach handelt es sich bei Phe232Cys um eine aktivierende Punktmutation. In zellbiologischen Experimenten konnte dennoch gezeigt werden, dass eine Zellstimulation mit TSLP eine zusätzliche Wachstumssteigerung hervorrufen kann. Somit scheint die Bildung eines Heterodimers aus der mutierten hTSLPR-Kette und der hIL-7 α -Kette trotzdem möglich zu sein (Yoda et al. 2010, Hertzberg et al. 2010, Chapiro et al. 2010).

Genetische Abweichungen von JAK2

Die Punktmutation JAK2R683 in der Pseudokinase-Domäne der Januskinase 2 (JAK2) stellt eine weitere genetische Abweichung dar, die mit einer hTSLPR-Überexpression assoziiert ist. Dabei tritt die Transition der Aminosäure Arginin durch Glycin am häufigsten

auf, ein Austausch mit Serin oder Threonin ist hingegen seltener. Die Mutation wurde bei 42,9 % adulter B-ALL mit einer hTSLPR-Überexpression (Yoda et al. 2010) und in 28 – 46 % der Fälle bei Patienten mit DS-ALL nachgewiesen (Kearney et al. 2009, Russell et al. 2009). Da bei 100 % der Patienten, welche die mutierte JAK2 aufweisen, gleichzeitig eine Überexpression des hTSLP-Rezeptors zu beobachten ist, wird dem Rezeptor eine übergeordnete Funktion zugeschrieben, die essentiell für den pathologischen Effekt der JAK2-Mutation zu sein scheint. Es konnte gezeigt werden, dass die JAK2-Mutation in Kombination mit der hTSLPR-Kette zu einem zytokinunabhängigem Zellwachstum führt. Anhand von Co-Immunpräzipitations-Experimenten wurde eine direkte Interaktion der humanen TSLP α -Kette mit phosphorylierter JAK2 bestätigt. Da die hTSLP α -Kette im Gegensatz zu anderen Typ I Zytokinrezeptoren lediglich über eine JAK-Bindungsregion und nur einen Tyrosinrest in ihrer C-terminalen Domäne verfügt, ist ihre Bindung an JAK2 und die daraus resultierende Aktivierung im Normalfall eher schwach ausgeprägt. Durch eine Steigerung der hTSLP α -Expression wird diese Bindung womöglich intensiviert, was eine stärkere Aktivierung zur Folge hat (Bercovich et al. 2008, Kearney et al. 2009, Mullighan et al. 2009, Russell et al. 2009, Yoda et al. 2010, Hertzberg et al. 2010).

Genetische Abweichungen der hIL-7 α -Kette

Vor kurzem wurde die aktivierende somatische Mutation IL-7RS185C der extrazellulären Domäne der hIL-7 α -Kette entdeckt, welche in ca. 6 % der B-ALL-Fälle mit einer hTSLPR-Überexpression nachgewiesen werden konnte. Eine Koexpression der mutierten IL-7RS185C-Kette und der hTSLP α -Kette führt zu einem zytokinunabhängigen Zellwachstum und einer konstitutiven Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5 sowie des ribosomalen Proteins S6 (RPS6) (Shochat et al. 2011). Der Grund für die assoziierte hTSLPR-Überexpression ist noch nicht bekannt.

2.4 Antikörper und ihre Bedeutung in der Diagnostik und Therapie

Antikörper sind lösliche, Y-förmige Immunglobuline, welche im Rahmen einer humoralen Immunantwort in Reaktion auf ein Antigen von B-Plasmazellen produziert werden. Sie werden allerdings auch als membrangebundene Immunglobuline auf der Zelloberfläche von B-Zellen exprimiert, wo sie die Funktion eines Rezeptors erfüllen, des sogenannten B-Zell-Rezeptors (BCR). Ein Antikörpermolekül setzt sich aus mindestens zwei schweren Ketten (*heavy chains*) und zwei leichten Ketten (*light chains*) zusammen.

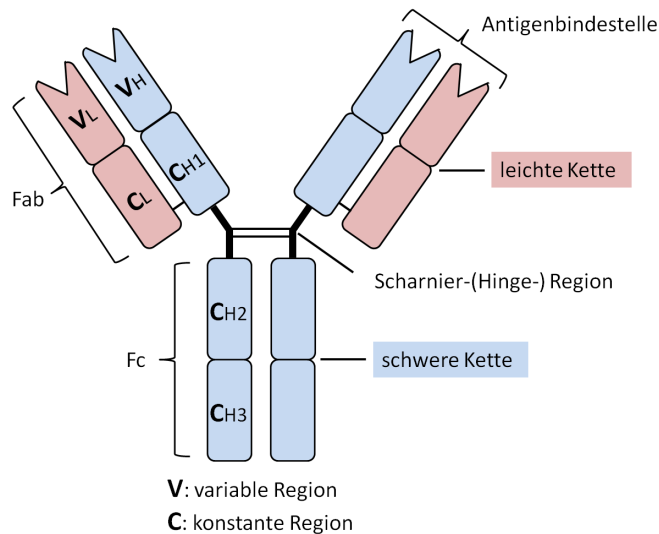


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers

Das IgG-Antikörpermolekül setzt sich aus zwei schweren Ketten (H: *heavy chain*, blau) und zwei leichten Ketten (L: *light chain*, rosa) zusammen. Die schweren Ketten sind untereinander über zwei Disulfidbrücken verbunden, die leichten Ketten binden über jeweils eine Disulfidbrücke an die schwere Kette. Die schweren Ketten bestehen aus einer variablen Domäne (VH) und drei konstanten Domänen (CH1, CH2, CH3). Die leichten Ketten weisen eine variable Domäne (VL) und eine konstante Domäne (CL) auf. Die variablen Regionen beider Ketten bilden jeweils die spezifische Antigenbindestelle. Der Schenkel oberhalb der Scharnier-(Hinge)-Region bildet den Fab-Abschnitt (*fragment antigen binding*), der untere Schenkel den Fc-Abschnitt (*fragment crystallizable*).

(modifiziert nach (Rassow et al. 2008))

Die schweren Ketten sind untereinander durch zwei Disulfidbrücken verbunden, die leichten Ketten binden über jeweils eine Disulfidbrücke an die schweren Ketten. Die leichten Ketten bestehen aus einer konstanten und einer variablen Region. Schwere Antikörperketten setzen sich aus drei konstanten und einer variablen Region zusammen. Die variablen Regionen beider Ketten bilden jeweils die spezifische Antigenbindestelle (siehe Abbildung 2.4). Bei den leichten Ketten werden die zwei Kettentypen κ und λ unterschieden, wobei jedoch nur ein Kettentyp in einem Antikörpermolekül vertreten ist. In Abhängigkeit von der konstanten Region der schweren Kette werden die Antikörperhauptklassen (Isotypen) IgM, IgD, IgA, IgE und IgG differenziert. Diese weisen die schweren Ketten μ , δ , α , ε oder γ auf. Die Hauptklassen IgG und IgA werden weiterhin in die Subklassen IgA1, IgA2 und IgG1–IgG4 unterteilt. In frühen Stadien einer Immunantwort werden vorwiegend IgM und IgD, in späteren Stadien IgA, IgE und IgG gebildet. Der IgG-Isotyp, wie in Abbildung 2.4 dargestellt, ist der am häufigsten sezernierte Antikörper und macht im menschlichen Blut einen Anteil von 75 % aus. Monoklonale Antikörper werden von identischen B-Plasmazell-

klonen produziert und sind monospezifisch, d.h. sie erkennen nur ein einziges Epitop eines Antigens. Polyklonale Antikörper hingegen werden von verschiedenen B-Zellklonen gebildet und erkennen unterschiedliche Epitope desselben Antigens (Rassow et al. 2008). Monoklonale Antikörper spielen heutzutage bei der Diagnostik und Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen sowie bei der Arzneimittelherstellung eine bedeutende Rolle. Vor zehn Jahren wurden bereits über 400 therapeutische monoklonale Antikörper der klinischen Prüfung unterzogen, 11 wurden in den USA zu diesem Zeitpunkt schon angewendet (Gura 2002). Die Anzahl der zur Verfügung stehenden und zu therapeutischen Zwecken eingesetzten Antikörper ist seitdem enorm angestiegen, was durch weiterentwickelte Technologien und rege Forschung erreicht werden konnte. 2012 umfasste die Zahl bereits 26 Präparate mit beachtenswerten Umsätzen (Wild 2012). Ferner nehmen Antikörper einen hohen Stellenwert in Immunglobulin-gestützten *in-vitro* Methoden wie der Immunhistochemie, der Immunpräzipitation, dem ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) oder der Durchflusszytometrie ein. Die genannten Verfahren kommen unter anderem zur Beurteilung von Zielmolekülen bei der Arzneimittelentwicklung und Forschung im Rahmen der sogenannten *target validation* zum Einsatz (Lang und Thompson 2006). 1986 wurde Muromonab-CD3 als erster monoklonaler Antikörper zur therapeutischen Anwendung zugelassen. Muromonab ist ein muriner anti-CD3-Antikörper, welcher gegen T-Lymphozyten gerichtet ist und gegenwärtig bei Steroid-resistenten Abstoßungskrisen nach Nieren-, Leber- und Herztransplantationen appliziert wird (Smith 1996). Heutzutage werden Antikörper besonders zur Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen, zur Immunsuppression von chronisch entzündlichen Erkrankungen, zur Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen und zur anti-viralen Therapie eingesetzt. Dabei ist die Antikörperspezifität bezüglich eines Zielmoleküls für den gewünschten Erfolg ausschlaggebend. Das Konzept des *molecular targeting* minimiert die Beeinträchtigung der Funktion gesunden Gewebes und die dadurch hervorgerufenen Nebenwirkungen (Imai und Takaoka 2006). Der therapeutische Effekt beim Einsatz monoklonaler Antikörper kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Manche Antikörper sind in der Lage, Rezeptorspezifische Substrate aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu imitieren und durch die Bindung an den entsprechenden Rezeptor eine Aktivierung desselben auszulösen (van Dijk und van de Winkel 2001). Ein Beispiel für einen solchen agonistischen Antikörper ist der humane monoklonale Antikörper Mapatumumab (HGS-ETR1), welcher den Apoptose-induzierenden Liganden TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) nachahmt und an den TRAIL-Rezeptor 1 bindet. In der Folge wird in Tumorzellen die Apoptose ausgelöst. Derzeit wird die Wirkung von Mapatumumab auf hepatische Metastasen des kolorektalen Karzinoms untersucht (Pukac et al. 2005, Song et al. 2012). Im Gegensatz dazu blockieren inhibitorische Anti-

körper die Substratbindungstelle von Rezeptoren, woraufhin diese und die damit assoziierten intrazellulären Signalkaskaden gehemmt werden. Diesen Effekt macht man sich vor allem in der Krebstherapie zunutze, da die Beeinflussung der tumoreigenen Signaltransduktion zu einem veränderten Malignitätsverhalten führen kann (Cragg et al. 1999). Der Rezeptorantagonist Trastuzumab (Herceptin[®]) beispielsweise blockiert den HER2-Kinase-Rezeptor (*Human epidermal growth factor receptor 2*), welcher aufgrund einer Amplifikation des *erbB2*-Gens (*Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) an der Oberfläche von Brustkrebszellen überexprimiert wird. Aufgrund seiner antiproliferativen Wirkung wird Trastuzumab beim metastasierten Mammakarzinom mit einer HER2-Rezeptor-Überexpression eingesetzt (Ceran et al. 2012). Des Weiteren können Antikörper als Trigger des Immunsystems fungieren. Im Rahmen der Immuntherapie bei Tumorerkrankungen spielt die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität eine wichtige Rolle. Dabei werden Tumorzellen von Antikörpern opsonisiert und durch eine Interaktion mit den Fc γ -Rezeptoren von den Effektorzellen erkannt und unschädlich gemacht. Auf diese Weise moduliert beispielsweise Rituximab (MabThera[®], Rituxan[®]), ein chimärer monoklonaler anti-CD20-Antikörper, der unter anderem bei malignen Lymphomen eingesetzt wird (Vose et al. 2001), die Zytotoxizität auf myeloide Krebszellen (Clynes et al. 2000). Darüber hinaus werden Antikörper aufgrund ihrer neutralisierenden Wirkung durch ihre Bindung an lösliche Strukturen, wie Hormone, Zytokine, Chemokine, Toxine oder Krankheitserreger, eingesetzt. Darauf beruht das Prinzip der passiven Impfung, welche beispielsweise nach Exposition viraler Infektionen, wie der Tollwut, indiziert ist (van Dijk und van de Winkel 2001, Both et al. 2012). Die Wahl des geeignetsten Isotypen ist für die Realisierung des therapeutischen Effektes bestimmter Erkrankungen und zur Umgehung von Unverträglichkeitsreaktionen essentiell. Der im menschlichen Blut am häufigsten vorkommende Antikörper-Isotyp IgG1 weist eine besonders lange Halbwertszeit von über 20 Tagen auf, da IgG-Antikörper durch die Wechselwirkung mit dem auf endothelialen Zellen lokalisierten FcRn-Rezeptor (neonataler Fc-Rezeptor) vor intrazellulärem Abbau geschützt werden. Zusätzlich ist IgG1 in der Lage, mit dem Immunsystem zu interagieren, weswegen er in der Therapie der bisher meist eingesetzte Isotypenantikörper ist (Junghans 1997, van Dijk und van de Winkel 2001).

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper stehen mittlerweile verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Grundlage für das Verfahren der Gewinnung monoklonaler Antikörper aus Hybridomaklonen schafften C. Milstein, G. Köhler und N. Jerne, die im Jahr 1984 für diese Leistung den Nobelpreis für Medizin erhielten. In Reaktion auf die Immunisierung eines Organismus mit dem Zielantigen, welches ein Protein, Peptid, Polysaccharid, Polynukleotid oder Lipid sein kann (Luttmann et al. 2009), werden B-Plasmazellen gebildet,

die aus dem Organismus isoliert und mit Tumorzellen fusioniert werden. Die sogenannten Hybridomas können unbegrenzt proliferieren und Antikörper sezernieren. Die gewonnenen Antikörper werden anschließend bezüglich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber dem Zielantigen durchgemustert (Köhler und Milstein 1975). Im Unterschied dazu gewinnt die Erzeugung rekombinanter Antikörper für die Diagnostik und die Entwicklung proteino-gener Therapeutika zur Krebs- und antiviralen Therapie zunehmend an Bedeutung. Die Immunisierung eines Organismus ist dafür nicht mehr notwendig, da Antikörper künstlich entworfen, selektioniert und modelliert werden. Die sogenannte *Phagen-Display-Selektion* beispielsweise ist ein alternatives Verfahren zur Gewinnung spezifischer monoklonaler Antikörper. Hierbei werden Bakteriophagen, welche rekombinante, aus Antikörperbibliotheken stammende Antikörperfragmente an ihrer Oberfläche präsentieren, über die Bindung an ihr fixiertes Antigen selektioniert und ihre genetische Information amplifiziert und sequenziert. Mithilfe von Bakterien werden schließlich lösliche, Antigen-spezifische Antikörper hergestellt. Anhand solcher molekularer Strategien und des Zugriffs auf Antikörperbibliotheken wird eine mit dem natürlichen Immunsystem nahezu vergleichbare Antikörpervariabilität geschaffen (Smith 1985, Wohlgemuth und Li 2012). Neue Ansätze liegen in der Fusion von Antikörperfragmenten mit Fremdmolekülen, wie Radioisotypen, Medikamenten, Toxinen, Enzymen und Biosensoren. Davon verspricht man sich einen noch größeren Effekt auf die Zielzellen (Hudson 2000, Krauss 2003). Zevalin[®] beispielsweise ist ein Radio-Immunotherapeutikum, welches zur Behandlung rezidivierter follikulärer Lymphome eingesetzt wird. Hier wurde der murine monoklonale anti-CD20-Antikörper Ibritumomab, ein Vorgänger des Rituximab, über einen Linker mit dem Betastrahler ⁹⁰Yttrium verbunden. Mithilfe des Antikörpers werden die Zielzellen angesteuert, das Radioisotop bestrahlt anschließend die Tumormasse (Lohri und Herrmann 2004). Die Anti-Tumorthherapie entwickelt sich dahingehend, dass verschieden spezifische monoklonale Antikörper simultan eingesetzt werden, um verschiedene Signalkaskaden innerhalb der Tumorzellen erfassen und beeinflussen zu können. Des Weiteren werden monoklonale Antikörper zunehmend in Kombination mit Chemo- und Radiotherapien angewendet. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die synergistische Interaktion der Therapien offenbar zu besseren Erfolgen führt (Pegram et al. 2000, Vose et al. 2001, Harari und Huang 2001, Gura 2002). Vor ihrem therapeutischen Einsatz müssen Antikörper strenge Kontrollen durchlaufen, um die gewünschten Effekte zu gewährleisten und Unverträglichkeitsreaktionen beim Patienten auf ein Minimum zu reduzieren. Da die Anwendung muriner Antikörper beim Menschen zu einer Induktion anaphylaktischer Reaktionen führen kann (Meeker et al. 1985, Wohlgemuth und Li 2012), sollten lediglich humane bzw. humanisierte Antikörper für eine Therapie appliziert werden. Der Erwerb monoklonaler Antikörper stellt sich

nach wie vor als sehr kostenintensiv dar. Rituximab beispielsweise verursacht pro Jahr Kosten von über 500 Millionen US-Dollar. Allein die Herstellung von 1 g Antikörper aus Zellkulturen in Bioreaktoren kostet 1000 US-Dollar. In einer Pressemitteilung des Wissenschaftlichen Instituts der PKV (WIP) wird der Einsatz monoklonaler Antikörper als „finanzielle Herausforderung für das Gesundheitswesen“ bezeichnet (Wild 2012). Darüber hinaus entwickelt sich zunehmend ein Ungleichgewicht zwischen der Anzahl neuer verfügbarer Antikörper und der Anzahl geeigneter Produktionsanlagen. Durch eine Effizienzverbesserung der herkömmlichen Antikörperproduktion bzw. durch ein Ausweichen auf zellkulturfreie Systeme, sollen die Kosten in Zukunft reduziert werden (Gura 2002). Neue Antikörpertechnologien könnten dazu beitragen, dass in Zukunft immer mehr Patienten von Antikörpertherapien profitieren werden.

3 Ziele der Arbeit

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass das Zytokin *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) und sein Rezeptor (TSLPR) sowohl eine Rolle bei der Entwicklung atopischer Erkrankungen als auch bei der Entstehung maligner Tumorerkrankungen spielen. Erst seit kurzem wird eine Überexpression des humanen TSLP-Rezeptors mit dem ungünstigen Verlauf einer Form der Leukämie, der akuten lymphatischen Leukämie der B-Zellen (B-ALL), in Verbindung gebracht. Da die Wirkung von TSLP und die Bedeutung seines Rezeptors im Rahmen allergischer Erkrankungen bereits mehrfach thematisiert wurde, sollte sich diese Arbeit auf Untersuchungen malignitätsassoziierten Eigenschaften des humanen TSLP-Rezeptors bei der B-ALL konzentrieren. Zunächst sollten mithilfe der Hybridomatechnik funktionelle monoklonale Antikörper gewonnen werden, welche gegen den humanen TSLP-Rezeptor gerichtet sind. Dabei stand die Identifizierung monoklonaler Antikörper zur Erkennung des nativ exprimierten hTSLP-Rezeptors in der Durchflusszytometrie und zur Detektion des denaturierten hTSLPR α_{ex} -Rezeptorproteins im Western-Blot im Vordergrund. Das zweite Ziel war der Nachweis des natürlicherweise exprimierten hTSLP-Rezeptors unter Einsatz der gewonnenen spezifischen, monoklonalen anti-hTSLPR-Antikörper. In diesem Zusammenhang sollten sowohl gesunde humane Blutzellen, wie Monozyten und B-Zellen, als auch Leukämiezellen von Patienten mit einer B-ALL auf eine Oberflächenexpression des Rezeptors durchgemustert werden. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Reagibilität von hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen auf eine Stimulation mit hTSLP. Dabei sollte das Proliferationsvermögen beurteilt und der Phosphorylierungsgrad des Transkriptionsfaktors STAT5 anhand von Western-Blot-Detektionen ermittelt werden. Der zweite Teil dieser Arbeit sollte die Identifizierung und Charakterisierung monoklonaler anti-hTSLPR-Antikörper mit inhibitorischen Eigenschaften umfassen. Dieses Ziel sollte mittels Reporterassays, Proliferationsinhibitionassays und Western-Blot-Analysen anhand der hTSLP-abhängigen murinen Ba/F3-hTSLPR-Zelllinie verfolgt werden. Im letzten Teil sollte untersucht werden, ob inhibitorische anti-hTSLPR-Antikörper hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen in ihren malignen Eigenschaften beeinflussen können. In diesem Kontext sollten einerseits Proliferationsinhibitionstests und andererseits Western-Blot-Detektionen zur Untersuchung einer möglichen Inhibition der hTSLP-induzierten STAT5-Tyrosinphosphorylierung von hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen durchgeführt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zellen

Zelllinien

Ba/F3	Die Zellen stammen aus einer murinen pro-B-Zelllinie, welche aus dem Knochenmark einer <i>BALB/c</i> -Maus generiert wurde (Palacios und Steinmetz 1985). Sie wachsen mIL-3-abhängig in Suspension und werden in 25 cm ² -Zellkulturflaschen in RFG-mIL-3-Medium kultiviert. Die Überlebenszeit in faktorfreiem Medium beträgt zwischen 24 – 36 h. Die Verdopplungszeit liegt bei etwa 20 h. Die Zellen weisen eine runde Morphologie auf.
Ba/F3-hTSLPR	Die ursprünglichen Ba/F3-Zellen wurden stabil mit dem humanen TSLP-Rezeptor transfiziert (Sebastian 2008). Sie wachsen hTSLP-abhängig in Suspension und werden in 25 cm ² -Zellkulturflaschen in RFG-hTSLP-Medium kultiviert. Die Überlebenszeit in faktorfreiem Medium beträgt zwischen 24 – 36 h. Die Verdopplungszeit liegt bei etwa 20 h. Die Zellen weisen eine runde Morphologie auf.
B-ALL-Zellen	Die Zelllinien HP, CR und SK stammen von primären Leukämiezellen von Patienten mit einer B-ALL im Alter von 23, 60 und 19 Jahren (Median 23 Jahre) (Nijmeijer et al. 2009). Die Zellen wurden von PD Dr. O. G. Ottmann und Susanne Badura, Institut für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums der Goethe-Universität Frankfurt, bereitgestellt. Die Langzeitkultur erfolgt in Suspension in serum- und wachstumsfaktorfreiem IMDM-HB-Medium bei einer Zelldichte von mindestens 1 x 10 ⁶ /ml. Die Zelllinien sind in Tabelle 1 näher charakterisiert.

Tabelle 1: Charakterisierung der B-ALL-Zelllinien

Zelllinie	HP	CR	SK
Patientenalter	23 Jahre	60 Jahre	19 Jahre
Leukämieform	common B-ALL	cμ ⁺ CD10 ⁻ B-ALL	pro-B-ALL
Genotyp primärer Zellen	47,XX,+i(21)	46,XY,+der(1) t(1;21)(q10;q10), der(13)t(12;13), der(14)t(1;14), der(18)t(13;18)	46,XY,t(11;19)
Genotyp nach 6 Monaten	46,XX,del(13), der(16)t(13;16), i(21)	47,X,-Y,+der(1) t(Y;1)(p11;q10), der(2)t(2;15), der(12)t(12;18), del(13),der(13) t(12;13),der(14) t(1;14),ider(14) t(4;14),ider(17) (q10)hsr(17), der(18)t(13;18), +20	47,XY, del(7)(p),+8, t(11;19)
Zellmorphologie	rund, singulär	rund, kolonieartig	rund, singulär
Verdopplungsrate	3,1 Tage	2,5 Tage	nicht bestimmt

(B-ALL = akute lymphatische Leukämie der B-Zellen; CD = *Cluster of differentiation*)

Hybridomas

Die Zellen sind Fusionszellen aus B-Zellen immunisierter Mäuse und Myelomzellen der Linie X63AG8.653. Sie wachsen in Suspension und werden in RFG-hIL-6-Medium kultiviert. Abhängig von ihrer Dichte werden sie in 5 cm²-, 25 cm²- bzw. 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Sie weisen eine runde Morphologie auf. Die Verdopplungszeit beträgt abhängig vom Einzelklon zwischen 24 – 48 h.

Primärzellen

PBMC Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) stammen aus heparinisierten Vollblutkonserven gesunder freiwilliger Spender. Diese wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Jena bereitgestellt. Die Isolierung der Zellen wird mittels Dichtezentrifugation durchgeführt (vgl. 4.2.7). Die Kultivierung frisch isolierter bzw. aufgetauter PBMCs erfolgt für 12 – 24 h in RFG-Medium in Suspension.

4.1.2 Zellkulturmedien

FCS Gold	Fetales Kälberserum (PAA)
Gefriermedium (Ba/F3)	RPMI 1640; 20 % FCS (v/v); 10 % DMSO (v/v)
Gefriermedium (Hybridomas)	RPMI 1640; 20 % FCS (v/v); 10 % DMSO (v/v)
Gefriermedium (B-ALL)	IMDM; 10 % DMSO (v/v)
Hessenbräu (HB)	bereitgestellt von PD Dr. O. G. Ottmann und Susanne Badura (Institut für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Goethe-Universität Frankfurt) (Nijmeijer et al. 2009)
IMDM	Medium mit stabilem L-Glutamin (PAA)
IMDM-HB	IMDM; 20 ml Hessenbräu; 5 ml 100 x Penicillin/Streptomycin
RFG	RPMI 1640; 10 % FCS (v/v); 50 µg/ml Gentamycin
RFG-hIL-6	RPMI 1640; 15 % FCS (v/v); 50 µg/ml Gentamycin; konditioniert mit 20 ng/ml rhIL-6

RFG-hTSLP	RPMI 1640; 10 % FCS (v/v); 50 µg/ml Gentamycin; konditioniert mit 10 ng/ml rhTSLP
RFG-mIL-3	RPMI 1640; 10 % FCS (v/v); 50 µg/ml Gentamycin; konditioniert mit 5 % mIL-3-haltigem Überstand der Zelllinie X63Ag8-653BPV-mIL-3 (Karasuyama und Melchers 1988)
RPMI 1640	Memorial Park Institute; Medium mit stabilem L-Glutamin (Biochrom AG)

4.1.3 Puffer und Lösungen

Block-Puffer	1 x TBS; 0,1 % Tween-20 (100 %)(v/v); 5 % Magermilchpulver
Coomassie-Färbelösung	0,25 % Coomassie; 45 % Methanol (v/v); 45 % H_2O (v/v); 10 % Essigsäure (v/v)
Elektrophoresepuffer (10 x)	250 mM Tris; 1 % SDS (w/v); 1,9 M Glycin
Glycinpuffer (0,1 x)	100 mM Glycin/ HCl pH 3
Lagerungspuffer (10 x)	1 x PBS ; 10 % BSA (w/v); 0,1 % NaN_3 (w/v)
Loading-Puffer (6 x)	0,9 g/l Bromphenolblau; 0,9 g/l Xylenecyanol; 60 % Glycerin (v/v); 60 mM EDTA
Lysepuffer	80 % NP-40-Lysepuffer; 15 % PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (v/v); 5 % Proteaseinhibitor complete Mini (v/v)
Natriumcarbonatpuffer (0,5 x)	120 mM Na_2CO_3 x $2H_2O$; 233 mM $NaHCO_3$ x $2H_2O$ / $NaOH$ pH 9,5

Natriumphosphatpuffer (500 x)	400 mM Na_2HPO_4 x $2H_2O$; 100 mM NaH_2PO_4 x $2H_2O$ / HCl pH 7,5
NP-40-Lysepuffer	25 mM Tris; 140 mM $NaCl$; 1 mM EDTA; 20 mM $Na_4P_2O_7$; 0,5 % NP-40 (v/v); pH 7,45
PBS-Puffer (5 x)	680 mM $NaCl$; 13,5 mM KCl ; 9 mM KH_2PO_4 ; 50 mM Na_2HPO_4 x 12 H_2O ; pH 7,4
PBS-T-Puffer (5 x)	680 mM $NaCl$; 13,5 mM KCl ; 9 mM KH_2PO_4 ; 50 mM Na_2HPO_4 x 12 H_2O ; pH 7,4; 0,1 % Tween-20
Phosphataseinhibitormix (50 x)	1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM Na_2MoO_4 x 2 H_2O ; 20 mM NaF
Ponceau-S-Mix	2 g/l Ponceau S; 30 g/l Trichloressigsäure; 30 g/l Sulfosalicylsäure
Proteinprobenpuffer (5 x)	25 mg Bromphenolblau; 500 mg SDS; 2 ml H_2O ; 1,5 ml 1M Tris/ HCl pH 6,8; 1,5 ml Glycerin; 0,55 ml 2- β -Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer	620 mM Tris/ HCl pH 6,8
Strippuffer	60 mM Tris/ HCl pH 6,7; 2 % SDS (w/v); 0,4 % 2- β -Mercaptoethanol
TBS-T-Puffer (5 x)	680 mM $NaCl$; 100 mM Tris/ HCl pH 7,6; 0,1 % Tween-20 (v/v)
Transferpuffer (1 x)	25 mM Tris/ HCl pH 7,5; 190 mM Glycin; 20 % Methanol (v/v)
Trenngelpuffer	2,5 M Tris/ HCl pH 8,0
Trypanblau-Lösung	4 % Trypanblau in PBS

4.1.4 Chemikalien

Acrylamid, Rotiphorese® Gel 40	Carl Roth GmbH & Co.
Albumin Fraktion V, BSA	Carl Roth GmbH & Co.
APS	Sigma-Aldrich GmbH
Aqua dest	B. Braun Melsungen AG
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co.
Coomassie Brilliant Blue	Carl Roth GmbH & Co.
DMSO	Carl Roth GmbH & Co.
EDTA	Carl Roth GmbH & Co.
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co.
FITC	Sigma-Aldrich GmbH
Gentamycin	Ratiopharm
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co.
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.
<i>HCl</i> , rauchend	Carl Roth GmbH & Co.
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co.
<i>KCl</i>	Carl Roth GmbH & Co.
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co.
2-β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.
<i>NaCl</i>	Carl Roth GmbH & Co.
$Na_2CO_3 \times 2H_2O$	Carl Roth GmbH & Co.
<i>NaF</i>	Sigma-Aldrich GmbH
$NaHCO_3 \times 2H_2O$	Carl Roth GmbH & Co.
$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	Carl Roth GmbH & Co.
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	Carl Roth GmbH & Co.
NaN_3	Carl Roth GmbH & Co.
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	Sigma-Aldrich GmbH
<i>NaOH</i>	Carl Roth GmbH & Co.
$Na_4P_2O_7$	Carl Roth GmbH & Co.
Na_3VO_4	Sigma-Aldrich GmbH
$(NH_4)_2SO_4$	Carl Roth GmbH & Co.
NP-40	Serva Electrophoresis GmbH
PageRuler TM Plus prestained Protein Ladder	Fermentas LifeSciences

Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co.
Proteaseinhibitor complete Mini	Roche Diagnostics GmbH
Roti [®] -Quant, Bradford	Carl Roth GmbH & Co.
SDS	Carl Roth GmbH & Co.
Sulfosalicylsäure	Carl Roth GmbH & Co.
TEMED	Carl Roth GmbH & Co.
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich GmbH
Tris	Carl Roth GmbH & Co.
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH
Tween [®] -20	Carl Roth GmbH & Co.
Xylencyanol	Carl Roth GmbH & Co.

4.1.5 Kits

CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega GmbH
CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	Promega GmbH
Cell Line Nucleofector [®] Kit V (10 RCT)	Amara (Lonza)
Cytotoxicity Detection <i>Kit^{Plus}</i> (LDH)	Roche GmbH
ELISA-Kit	R & D Systems
Luciferase Assay System	Promega GmbH
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche GmbH
NucleoBond [®] PC 100	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG.

4.1.6 Zytokine

rhIL-6 (Lyophilisat)	INVIGATE GmbH
rhTSLP (Lyophilisat)	INVIGATE GmbH
rmIL-3 (Lyophilisat)	INVIGATE GmbH

4.1.7 Analytische und inhibitorische Antikörper

Tabelle 2: Analytische Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Epitop	Spezies	Quelle
VGG12 (monoklonal, IgG1)	vgl. 5	hTSLPR α	Maus	vgl. 5.2.2
D9C10 (monoklonal)	vgl. 5	hTSLPR α	Maus	vgl. 5.2.2
anti-human TSLPR PE (monoklonal, IgG2a)	1 μ g/ml (FC)	hTSLPR α	Maus	eBioscience GmbH
anti-human TSLPR PE (monoklonal, IgG2a)	1 : 10 (FC)	hTSLPR α	Maus	BioLegend GmbH
anti-hTSLPR (polyklonal, IgG)	1 μ g/ml (WB), (FC); 2 μ g/ml (E)	hTSLPR α	Ziege	R & D Systems GmbH
IgG1 control	1 : 10 (FC), 2 μ g/ml (E)	Pflanzen- epitop	Maus	ImmunoTools GmbH
IgG2a control	1 : 10 (FC)	Pflanzen- epitop	Maus	ImmunoTools GmbH
IgG2b control	1 : 10 (FC)	Pflanzen- epitop	Maus	ImmunoTools GmbH
anti-P5D4 (monoklonal)	1 μ g/ml (FC),(WB), 2 μ g/ml (E)	P5D4- Epitop	Maus	(Wohlmann et al. 2010)
anti-His (monoklonal, IgG1)	2 μ g/ml (E)	His-Tag	Maus	Qiagen GmbH
anti-human CD19 PE	1 : 10 (FC)	humanes CD19	Maus	ImmunoTools GmbH
anti-human CD14 APC	1 : 10 (FC)	humanes CD14	Maus	ImmunoTools GmbH
anti-human CD127 APC	1 : 16 (FC)	hIL-7R α	Maus	eBioscience GmbH
anti-pSTAT1	1 : 200 (WB)	STAT1 (pTyr701)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

anti-STAT1	1 : 1000 (WB)	STAT1	Kaninchen	Cell Signaling Technology
anti-pSTAT3	1 : 500 (WB)	STAT3 (pTyr705)	Kaninchen	Cell Signaling Technology
anti-STAT3	1 : 1000 (WB)	STAT3	Kaninchen	Cell Signaling Technology
anti-pSTAT5	1 : 1000 (WB)	STAT5 (pTyr694)	Kaninchen	Cell Signaling Technology
anti-STAT5	1 : 1000 (WB)	STAT5	Kaninchen	Cell Signaling Technology

(CD = *Cluster of differentiation*; E = *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA); FC = Durchflusszytometrie; FITC = *Fluorescein isothiocyanate*; HRP = *Horseradish peroxidase*; PE = *Phycoerythrin*; pTyr = Phosphotyrosin; STAT = *Signal transducers and activators of transcription*; hTSLPR = humaner Rezeptor für *Thymic stromal lymphopoietin*; WB = Western-Blot)

Tabelle 3: Inhibitorische Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Epitop	Spezies	Quelle
1E10 (monoklonal)	vgl. 5	hTSLPR α	Maus	vgl. 5.2.2
6F4 (monoklonal)	vgl. 5	hTSLPR α	Maus	vgl. 5.2.2
1B11 (monoklonal)	vgl. 5	hTSLPR α	Maus	vgl. 5.2.2

(hTSLPR = humaner Rezeptor für *Thymic stromal lymphopoietin*)

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Epitop	Spezies	Quelle
anti-mouse FITC	1 : 50 (FC)	Maus-IgG	Ziege	ImmunoTools GmbH
anti-mouse PE	1 : 50 (FC)	Maus-IgG	Ziege	ImmunoTools GmbH
anti-goat FITC	1 : 50 (FC)	Ziegen-IgG	Affe	ImmunoTools GmbH

anti-mouse IgG HRP	1 : 10 000 (WB); 1 : 1000 (E)	Maus-IgG	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-goat IgG HRP	1 : 10 000 (WB); 1 : 1000 (E)	Ziegen- IgG	Affe	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-rabbit IgG HRP	1 : 10 000 (WB)	Kaninchen- IgG	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

(E = *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA); FC = Durchflusszytometrie; FITC = *Fluorescein isothiocyanate*; HRP = *Horseradish peroxidase*; PE = *Phycoerythrin*; WB = Western-Blot)

4.1.8 Verbrauchsmaterialien

Amicon[®] Ultra-4 Centrifugal Filter Units
 Blot Absorbent Filter Paper
 Dialysierschlauch Visking
 Elektroporationsküvetten
 ELISA-Platten
 Eppendorf-Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)
 Hybond-C Extra (Nitrocellulose-Blotmembran)
 Kryoröhrchen
 Protein A-Sepharose
 Protein A-Sepharose-Beads
 Röhrchen (15 ml, 50 ml)
 S-Monovette
 Spritzen Injekt[®]
 Sterilfilter (0,2 µm)
 Sterillium[®]
 Well-Platten (6-, 12-, 24-, 96-Well)
 96-Well-Platten black, white
 Zellkulturflaschen

Merck Millipore
 BioRad Laboratories GmbH
 Carl Roth GmbH & Co.
 Lonza
 Greiner bio-one GmbH
 Eppendorf AG
 Amersham Biosciences
 Greiner bio-one GmbH
 GE Healthcare
 Sigma-Aldrich GmbH
 Greiner bio-one GmbH
 Sarstedt AG & Co.
 B. Braun Melsungen AG
 Sarstedt AG & Co.
 Bode Chemie Hamburg
 Greiner bio-one GmbH
 Greiner bio-one GmbH
 Greiner bio-one GmbH

4.1.9 Geräte

Amaxa-Nucleofektor [®]	Amaxa (Lonza)
Äkta purifier [®]	GE-Healtcare
Blot-Kammer	BioRad Laboratories GmbH
CyFlow [®] space Durchflussszytometer	Partec GmbH
Drehrad	Hartenstein
DRI-Block [®] DB-2A	Techne
Elektrophoresekammer	BioRad Laboratories GmbH
Geldokumentationssystem	VWR International
Laborwaage	Sartorius AG
Laborzentrifuge Megafuge 1.0R	Hereaus Sepatech GmbH
Luminometer GloMax [®]	Promega GmbH
Photometer NanoDrop [®] 2000	PEQLAB GmbH
Schüttler KS-15	Edmund Bühler
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Thermo Scientific
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf AG

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung aller Zelllinien und primären Zellen erfolgte im Brutschrank unter Standardbedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO_2 . Alle Medien und Zusätze wurden unmittelbar vor ihrem Einsatz im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Generell wurden die Zellen beim Erreichen einer Zellzahl von 1×10^6 /ml Zellkulturmedium entweder 1 : 5 verdünnt oder bei 200 x g zentrifugiert und in neuem Medium ausgesät.

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Ermittlung der Zellzahl wurde die Zellsuspension für 1 min mit einer 4 %igen Trypanblaulösung im Verhältnis 1 : 1 inkubiert, woraufhin sich nur tote Zellen aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit anfärbten. Ein Deckgläschen wurde auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht und ein Tropfen gefärbter Zellsuspension an den Rand des Deckgläschens pipettiert. Dieser wurde durch die Wirkung von Kapillarkräften unter das Gläschen gezogen. Danach wurden ausschließlich vitale Zellen in den vier 4 x 4 Feldern

unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Die Endzellzahl (Zellzahl/ml) wurde durch Multiplikation der gemittelten Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

4.2.3 Einfrieren und Auftauen von Kryokonserven

Bei der Kryokonservierung wurden 1×10^6 sterile Zellen zweimal in 10 ml PBS-Puffer gewaschen und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml zellspezifischem Gefriermedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Nach 14 Tagen wurden die Kryokonserven für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Auftauen der Zellen wurde die gefrorene Zellsuspension in 10 ml 37°C warmem Nährmedium aufgetaut, wobei durch die sofortige Verdünnung einer Zellschädigung durch DMSO vorgebeugt wurde. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 200 x g zentrifugiert und nochmals mit 10 ml Medium gewaschen. Die Kultur wurde in 5 cm^2 - bzw. 25 cm^2 -Zellkulturflaschen angesetzt.

4.2.4 Starvieren von Zellen

Um Zellen von Wachstumsfaktoren, wie z.B. hTSLP oder mIL-3, zu befreien, wurden diese dreimal mit 10 ml faktorfreiem Medium gewaschen und jeweils für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Für Ba/F3- und Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurde RFG-Medium, für B-ALL-Zellen IMDM-Medium verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 6 h in faktorfreiem Medium kultiviert.

4.2.5 Transiente Transfektion

Ba/F3-Zellen bzw. Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden zunächst für 6 h in faktorfreiem RFG-Medium starviert (vgl. 4.2.4). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS-Puffer gewaschen und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Pro Ansatz wurden jeweils 1×10^6 Zellen mit 3 μg Plasmid und 100 μl Transfektionsreagenz V versetzt. Die Transfektion erfolgte mit dem Programm T-16 des Gerätes *Nucleofektor*[®] in Elektroporationsküvetten. Danach wurden die Zellen für mindestens 12 h in RFG-mIL-3- bzw. RFG-hTSLP-Medium kultiviert.

4.2.6 Subklonierung von polyklonen Hybridomakulturen

Die Gewinnung von Hybridoma-Einzelklonen aus polyklonen Hybridoma-Mischungen erfolgte nach der *limiting dilution*-Methode (Luttmann et al. 2009), welche in Abbildung 4.1 näher erläutert wird.

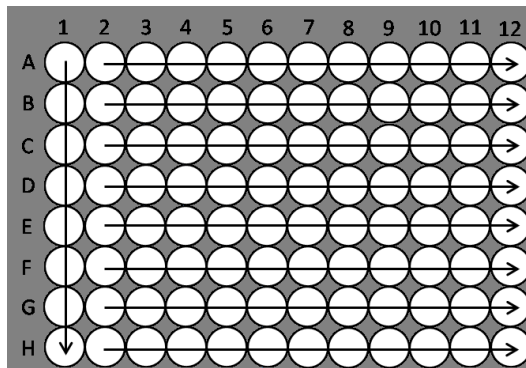


Abbildung 4.1: Schema der Subklonierung polykloner Hybridoma-Mischungen

Etwa 6×10^4 Zellen wurden mit 300 μ l RFG-hIL-6-Medium versetzt und in das linke obere Well (A1) einer 96-Platte gegeben. In die vertikal folgenden 7 Vertiefungen (B1–H1) wurden 150 μ l Zellsuspension aus dem jeweils vorangegangenen Well überführt und 1 : 1 mit Medium verdünnt. Ausgehend von der vertikalen Verdünnungsreihe (A1–H1) wurden nun auch in horizontaler Richtung aus jeweils 100 μ l entnommener Zellsuspension 1 : 1 Verdünnungen generiert, sodass sich in den letzten Vertiefungen statistisch gesehen keine Zellen mehr befanden. Die im rechten unteren Quadranten der Mikrotiterplatte gewachsenen Hybridoma-Kolonien wurden entnommen und auf jeweils verschiedenen 96-Well-Platten nach der beschriebenen Vorgehensweise einem zweiten Vereinzelungsschritt unterzogen. Danach wurden die im rechten unteren Bereich gewachsenen Kolonien mithilfe eines Lichtmikroskops begutachtet und die als Einzelklon-Kolonien bewerteten Zellen expandiert.

4.2.7 Präparation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC, *Peripheral blood mononuclear cells*) wurden aus getesteten, heparinisierten 500 ml Vollblutkonserven freiwilliger, gesunder Spender gewonnen (Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Jena). Die Auswahl der Konserven erfolgte zufällig und unabhängig von Blutgruppe und Geschlecht. Die Arbeit mit Zellmaterial aus humanem Vollblut wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt. Das Blut wurde zunächst in einem Verhältnis von 1 : 1 mit PBS-Puffer verdünnt. In einem 15 ml Röhrchen wurde das Blut vorsichtig über das Dichtegradientenmedium *Biocoll Separating Solution* (Biochrom AG) in einem Verhältnis von 4 : 1 geschichtet. Die Dichtezentrifugation erfolgte für 15 min bei 700 x g ohne Bremse bei Raumtemperatur. Danach wurde 1 ml des *Buffy Coats* abgenommen, im Verhältnis von 1 : 5 mit PBS-Puffer verdünnt und bei 700 x g zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen dreimal mit PBS-

Puffer gewaschen und entweder in RFG-Medium kultiviert oder in RFG-Gefriermedium bei -80 °C gelagert.

4.2.8 Zellproliferationsassay

Für Proliferationsassays wurden die Zellen der Ba/F3-hTSLPR-Linie und der B-ALL-Zelllinien HP, CR und SK für 6 h starviert (vgl. 4.2.4) und pro Vertiefung einer 96-Well-Platte 1×10^4 Zellen ausgesät. Anschließend folgte für 72 h bzw. 96 h die Stimulation mit aufsteigenden rhTSLP-Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von 100 μ l. Im Kontext von Inhibitionsassays wurden die ausgesäten Zellen für 1 h in einem Volumen von 100 μ l mit den angegebenen Antikörperkonzentrationen vorinkubiert. Die Ba/F3-hTSLPR-Linie wurde anschließend für 72 h, die Linie HP für 96 h mit 5 ng/ml bzw. 10 ng/ml rhTSLP stimuliert. Für die Auswertung von Proliferationsassays mittels *CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) wurden 30 μ l Zellsuspension eines jeden Wells auf eine weiße Luminometerplatte überführt und anschließend pro Vertiefung mit 30 μ l des Reagenzes versetzt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit in dunkler Umgebung und bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Lumineszenzeinheiten im Luminometer. Das Prinzip dieses Tests ist die Messung des Adenosintriphosphat (ATP)-Gehaltes metabolisch aktiver Zellen, welcher durch eine Luciferasereaktion luminometrisch erfasst wird (Promega 2012). Die Auswertung von *Dimethylthiazol-carboxymethoxyphenyl-sulfonyl-tetrazolium*-(MTS)-Proliferationsassays mittels *CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega) erfolgte gemäß den Herstellerangaben durch eine Absorbanzmessung bei 495 nm an einem Spektrophotometer (ELISA-Reader). Dafür wurden die Zellen für 1 h mit den entsprechenden Reagenzien unter Standardbedingungen inkubiert. Bei dieser Messung werden mithilfe von *Tetrazoliumsalzen* biologische Reduktionsvorgänge als Maß für die Stoffwechselaktivität metabolisch aktiver Zellen sichtbar gemacht. Dabei wird das gelbe *Tetrazoliumsalz* von den Zellen aufgenommen und dort durch Reduktionen mitochondrialer Dehydrogenasen in purpurfarbene *Formazane* umgewandelt, welche durch eine Absorptionsmessung quantifiziert werden (Promega 2009).

4.2.9 Zytotoxizitätstest

Grundprinzip des Zytotoxizitätstests ist die Aktivitätsmessung der *Laktat-Dehydrogenase* (LDH). Das Enzym ist im Plasma jeder Zelle lokalisiert und wird bei einer Schädigung der Zellmembran durch zelltoxische Substanzen nach außen ins Medium freigesetzt. Durch die katalytische Aktivität der LDH wird das im Test hinzugefügte *Laktat* zu *Pyruvat* oxidiert und NAD^+ (*Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid*) zu NADH/H^+ reduziert. Im zweiten

Reaktionsschritt findet ein H/H^+ -Transfer von $NADH/H^+$ auf das gelbe *Tetrazoliumsalz Iodonitrotetrazoliumchlorid* (INT) statt, welches zu rotem *Formazan* umgewandelt wird (Roche 2011). Die Absorbanz wird bei 495 nm gemessen und ist dementsprechend ein Maß für die LDH-Konzentration im Medienüberstand. In einer 96-Well-Platte wurden jeweils 1×10^4 Zellen für 16 h (Ba/F3-hTSLPR-Zellen) bzw. 96 h (B-ALL-Zellen) mit den zu prüfenden Antikörperkonzentrationen in einem Gesamtvolumen von 100 μ l inkubiert. Als Negativkontrollen dienten 100 μ l zellfreies Medium und 100 μ l unbehandelte Zellsuspension. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen lysiert, um die maximal mögliche LDH-Menge freizusetzen. Anschließend wurden die Reagenzien des *Cytotoxicity Detection Kit^{Plus}* (Roche) gemäß den Herstellerangaben angewendet.

4.2.10 Luciferase-Reportergenassay

Die Inhibitionstests von Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden in Form von *Reportergen-Mono-Assays* mit dem *Luciferase Assay System-Kit* (Promega) durchgeführt. Im Vorfeld wurden die Zellen transient mit dem P-STAT3-Reportergenkonstrukt *pGL3-SOCS3* (Wohlmann et al. 2010) transfiziert (vgl. 4.2.5) und in faktorfreiem RFG-Medium aufgenommen. Im Anschluss wurden pro Vertiefung einer 96-Well-Platte etwa 5×10^4 Zellen ausgesät und für 1 h mit jeweils 50 μ l Antikörperlösung in einem Gesamtvolumen von 100 μ l vorinkubiert. Dabei wurden versuchsabhängig entweder Antikörper aus der Protein A-Sepharose-Fällung aus Hybridoma-Überständen (vgl. 4.4.8) oder gereinigte Antikörper in den angegebenen Konzentrationen verwendet. Die Stimulation erfolgte anschließend mit 300 pg/ml rhTSLP. Das Zytokin bewirkt eine Aktivierung des Reportergenkonstrukts und reguliert somit die Expression der *Firefly-Luciferase*, was jedoch idealerweise durch inhibitorische Antikörper verhindert wird. Nach etwa 16 h Inkubationszeit wurden die Zellen für 15 min mit 30 μ l *1 x Reporter Lysis Buffer* in einem Gesamtvolumen von 50 μ l pro Well lysiert und anschließend mithilfe der Pipettierfunktion des *Luminometer GloMax[®]* (Promega) mit 30 μ l *Luciferase-Assay-Substrat I* versetzt. Die Aktivität der exprimierten und freigesetzten *Firefly-Luciferase* wurde luminometrisch anhand der Umsetzung des Substrates *Luciferin* zu *Oxyluciferin* bestimmt, welches Licht emittiert (Wood et al. 1984). Pro Well dauerte die Messung 5 s. Die Lumineszenzsignale sind Ausdruck des Grades der Lichtemission und somit ein Maß für die Hochregulation des Reportergenkonstruktes.

4.2.11 Statistische Berechnungen

Die Berechnung der Mittelwerte, Medianwerte und Standardabweichungen erfolgte mit *Microsoft[®] Office Excel 2007*. Die IC_{50} wurde mit den Programmen *SPSS[®]* und *SigmaPlot[®]*

ermittelt. Die Signifikanzanalyse wurde mit dem *Man-Whitney-U-Test* für ungepaarte Stichproben vorgenommen. Dabei wurden stets die Einzelwerte der Dreifachbestimmung betrachtet.

4.3 Durchflusszytometrische Methoden

4.3.1 Zellinkubation mit Antikörpern

Für die zytometrische Analyse wurden pro Ansatz etwa 1×10^5 Zellen für 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert und in 50 μ l PBS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden sie für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Drehrad mit einem primären Antikörper inkubiert. Versuchsabhängig wurden dabei entweder 100 – 200 μ l Hybridoma-Medienüberstand verwendet oder eine Antikörperkonzentration von 1 μ g/ml eingesetzt. Für die Analyse mehrerer Antikörper wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern koinkubiert. Nach einem Waschschrift mit jeweils 1 ml PBS-Puffer wurde das Zellpellet in einem Volumen von 50 μ l PBS-Puffer resuspendiert. Der sekundäre Fluorophor-gekoppelte anti-mouse- bzw. anti-goat-Antikörper wurde der Zellsuspension für 30 min in einem Verhältnis von 1 : 50 hinzugefügt, wobei alle Fluorophor-gekoppelten Antikörper stets in abgedunkelter Umgebung inkubiert wurden. Nach zwei weiteren Waschschriften erfolgte die zytometrische Analyse.

4.3.2 Einstellung der Parameter am Durchflusszytometer

In Vorbereitung auf die zytometrische Analyse wurde zunächst eine Optimierung der Einstellungen am Durchflusszytometer *CyFlow[®] Space* (Partec GmbH) vorgenommen. Dafür wurden unbehandelte Zellen der entsprechenden Zelllinie verwendet, welche im Vorfeld nur den Waschritten unterzogen, jedoch nicht mit Antikörpern inkubiert worden waren (vgl. 4.3.1). Etwa 2×10^4 Zellen wurden in einem logarithmisch skalierten *Forward scatter-Side scatter* (*FSC-SSC*)-Diagramm mittig dargestellt. Das Diagramm bildet Zellen anhand ihrer Größe (*FSC*-Achse) und Granularität (*SSC*-Achse) in Form eines Punktdiagramms (*Dot-Plots*) ab. Um unspezifische Signale bei der Fluoreszenzmessung auszuschließen, die von der Autofluoreszenz nicht-vitaler Zellen herrührt, musste im Vorfeld für jede Zelllinie eine Abgrenzung vitaler von toten Zellen vorgenommen werden. Die Unterscheidung erfolgte mittels rotfluoreszierendem *Propidiumiodid* (Daten nicht gezeigt), welches tote Zellen durch das Fehlen einer intakten Zellmembran anfärbt. Auf dieser Grundlage wurde im *FSC-SSC*-Diagramm stets ein polygonales Analysefenster (*Gate*) um vitale Zellen gesetzt

und die dazugehörigen Histogramme so eingestellt, dass sie nur Signale der Zellen im Analysefenster abbildeten. Histogramme stellen die Fluoreszenzstärke (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse) in Form einer Gauß-Verteilungskurve dar, wobei in dieser Arbeit für die x-Achse eine logarithmische, für die y-Achse eine lineare Skaleneinteilung gewählt wurde. *Dot-Plots* wurden auf beiden Achsen logarithmisch eingeteilt. Um eine nahezu einheitliche Auswertung der zytometrischen Zellanalyse zu verschiedenen Messzeitpunkten zu gewährleisten, wurde das Hintergrundsignal unbehandelter Zellen durch die manuelle Einstellung im Menüpunkt *Instrumentsettings* des Programms *FloMax* sowohl bei Histogrammen als auch bei *Dot-Plots* etwa auf den Bereich von 1×10^0 – 10^1 Fluoreszenzeinheiten (x-Achse) positioniert. Abhängig vom Fluoreszenzfarbstoff wurden die Diagramme auf die entsprechenden Fluoreszenzkanäle (FL) eingestellt, wobei *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) in FL-1, *Phycoerythrin* (PE) in FL-2 und *Allophycocyanin* (APC) in FL-5 abgebildet wurden. Pro Messung wurde die Fluoreszenz von etwa 1×10^4 Zellen im Analysefenster detektiert.

4.3.3 Auswertung zytometrischer Daten

Die Auswertung und Darstellung der zytometrischen Messungen erfolgte mit dem Programm *Cytflogic*. Die relativen Fluoreszenzstärken der gemessenen Zellen wurden im Vergleich zur Negativkontrolle, welche jeweils grau unterlegt sind, in sogenannten *Overlay-Histogrammen* dargestellt. Die prozentualen Anteile von Teilpopulationen in Bezug auf die Zielpopulation im Analysefenster (*Gate*) wurden in *Dot-Plots* anhand manuell gesetzter Quadranten durch die statistische Analyse mithilfe des Programms bestimmt. Die Quadranten wurden so gesetzt, dass die beiden oberen und der rechte untere Quadrant Zellen der Negativkontrolle mit prozentualen Anteilen von $< 1 \%$ in Bezug auf die Gesamtpopulation anzeigten.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Zellstimulation für die STAT-Tyrosinphosphorylierung

Die Zellen der Linien Ba/F3-hTSLPR bzw. HP wurden zunächst für 6 h oder 12 h in faktorfreiem Medium starviert (vgl. 4.2.4). Für Inhibitionsversuche mit anti-hTSLPR-Antikörpern wurden 1×10^6 Zellen in 24-Wellplatten für 1 h bzw. 12 h mit entsprechenden Antikörperkonzentrationen in einem Gesamtvolumen von 250 μl vorinkubiert. Die Negativkontrolle wurde mit einem äquivalenten Volumen PBS versetzt. Danach wurden die Zellen für 30 min mit 10 ng/ml rhTSLP stimuliert. Um die Phosphorylierungsreaktion zu unterbrechen, wurden die Proben unmittelbar danach für 15 min auf Eis gestellt,

zweimal 5 min bei 4 °C und 500 g zentrifugiert und jeweils in eiskaltem PBS resuspendiert. Schließlich wurden aus den vorbehandelten Zellen Lysate für den Western-Blot hergestellt oder die Proben bei -80 °C zwischengelagert.

4.4.2 Herstellung von Zelllysaten

Stimulierte bzw. unstimulierte Zellen wurden für 30 min mit 20 – 40 µl NP-40-Lysepuffer versetzt und auf Eis gelagert. Damit die Proteine nicht durch zelleigene Enzyme dephosphoryliert oder abgebaut werden konnten, wurden dem Lysepuffer zusätzlich Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt. Danach wurden die Proben fünfmal im Wechsel in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei 37 °C im Heizblock aufgetaut, um die Zellkerne aufzuspalten und die darin enthaltenen Proteine freizusetzen. Die Zelllysate wurden zentrifugiert und die Proteine für den Western-Blot verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

4.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Um im Western-Blot gleiche Proteinmengen zu gewährleisten, erfolgte im Vorfeld stets die Bestimmung des Proteingehalts der hergestellten Zelllysate mithilfe der Methode nach Bradford (Bradford 1976). Dafür wurden jeweils 2 µl jeder Probe mit 1 ml Bradford-Lösung (1 : 5 Roti-Quant® und Aqua dest) gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels Extinktionsmessung bei 595 nm am *NanoDrop 2000 Spectrometer* (peQLab Biotechnologie GmbH) anhand einer Eichkurve, welche zuvor aus einer Proteinstandardreihe unterschiedlicher BSA-Konzentrationen erstellt worden war.

4.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zunächst wurden 1 mm dicke Polyacrylamidgele gegossen, welche sich zu $\frac{4}{5}$ aus dem Trenngel und zu $\frac{1}{5}$ aus dem Sammelgel zusammensetzen (siehe unten). Das Trenngel wurde mit etwa 1 ml Isopropanol geglättet. In das Sammelgel wurde abhängig von der Probenzahl ein 10er oder 15er Kamm eingesteckt. Für die SDS-Gelelektrophorese wurde eine spezielle Elektrophoreseapparatur (Biorad) und 1 x Elektrophoresepuffer verwendet. Versuchsabhängig wurden entweder rekombinante Proteine oder Proteine aus Zelllysaten aufgetrennt, wobei Proteinmengen von 100 – 80 µg aufgetragen wurden. Die Proben wurden mit Proteinprobenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock gekocht, wobei die Proteine denaturiert, durch den Probenpuffer jedoch vor dem Ausfällen geschützt wurden.

Anschließend wurden die Proben auf das vorbereitete Polyacrylamidgel aufgetragen, wo sie sich dank des Proteinprobenpuffers und der somit erhöhten Dichte am Boden der Taschen sammelten. Als Proteingrößenreferenz (Marker) dienten 3 µl *PageRulerPlus prestained Proteinmarker* (Fermentas LifeSciences). In den ersten 20 min reicherten sich die Proben im Sammelgel bei 100 V und 250 mA an, in den folgenden 60 – 90 min wurden die Proteine bei 180 V und 500 mA im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt.

Sammelgel	2 ml Aqua dest; 1,3 ml Sammelgelpuffer; 0,7 ml Acrylamid (40 %); 1 ml Glycerin (40 %); 25 µl SDS (20 %); 40 µl APS (10 %); 10 µl TEMED
8,4 % Trenngel	3,3 ml Aqua dest; 2 ml Trenngelpuffer; 2,5 ml Acrylamid (40 %); 4 ml Glycerin (40 %); 50 µl SDS (20 %); 50 µl APS (10 %); 10 µl TEMED
12,5 % Trenngel	2,1 ml Aqua dest; 2 ml Trenngelpuffer; 4,5 ml Acrylamid (40 %); 4 ml Glycerin (40 %); 50 µl SDS (20 %); 50 µl APS (10 %); 10 µl TEMED

4.4.5 Western-Blot

Nach ihrer Auftrennung mittels der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. In einer speziellen Blot-Vorrichtung wurde die Membran auf dem Gel positioniert und nach dem *Sandwich*-Prinzip zu beiden Seiten blasenfrei mit einer Schicht Filterpapier und einer Schicht Schwämmen umhüllt. Der Proteintransfer erfolgte innerhalb von 2 h bei 350 mA und 100 V in 1 x Transferpuffer. Anschließend wurde die Membran für 10 min mit Ponceau-S-Mix reversibel gefärbt und vorsichtig mit Aqua dest abgespült. Die sichtbaren Banden gaben Aufschluss über den gelungenen Proteintransfer, den Grad der Auftrennung und die gleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Spuren. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde die Membran für 1 h mit 5 % Block-Puffer versetzt und anschließend zweimal 5 min mit 1 x TBS-T-Puffer gewaschen. Danach wurde sie für etwa 12 h bei 4 °C auf dem Kippschüttler mit 10 ml einer primären Antikörperlösung (siehe unten) in einer Konzentration von 1 µg/ml inkubiert. Nachdem die Antikörper entfernt worden waren, wurde die Membran dreimal 20 min gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit 10 ml einer Lösung sekundären *Horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Antikörpers (siehe unten) inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und mit 500 µl *Lumi-Light Western Blotting Substrate* versetzt.

Bei erfolgter Antikörperbindung an das Zielprotein wurde das Substrat enzymatisch durch HRP umgesetzt und die dabei emittierten Lichtsignale detektiert. Die Membran wurde entweder bei -20 °C zwischengelagert oder sogleich im 56 °C warmen Wasserbad für 10 min in Strippuffer eingelegt, um die gebundenen Antikörper zu entfernen und die Membran für andere Antikörper zugänglich zu machen. Durch das *Strippen* konnte die Membran etwa viermal verwendet werden.

primäre Antikörperlösung	1 x TBS-T; 5 % BSA (w/v); 0,02 % NaN_3 (w/v); primärer Antikörper in der angegebenen Verdünnung
sekundäre Antikörperlösung	1 x TBS-T; HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper im Verhältnis 1 : 10 000

4.4.6 Dot-Blot

Der Dot-Blot stellt eine abgewandelte Form des Western-Blots dar. Dafür wurden zunächst Nitrozellulosemembranen in Form kleiner Quadrate in den Kavitäten einer 24-Well Platte positioniert. Pro Ansatz wurden mit Ausnahme der Leerprobe 100 ng rekombinantes Protein mit 3 µl 5 x ungefärbtem Proteinprobenpuffer und 17 µl Aqua dest versetzt. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 95 °C gekocht, jeweils in die Mitte der Membran getropft und getrocknet. Danach wurden die Membranen für 1 h mit 5 % Block-Puffer und anschließend für 12 h mit jeweils 800 µl Überstand ausgewählter Hybridoma-Einzelklone bzw. mit dem gleichen Volumen des gereinigten P5D4-Antikörpers in der Konzentration von 1 µg/ml bei 4 °C inkubiert. Die Negativkontrollen wurden mit 1 x TBS-T-Puffer versetzt. Nachdem die Membranen dreimal 20 min mit 1 x TBS-T-Puffer gewaschen worden waren, wurden sie mit Ausnahme der Leerprobe mit 1 ml sekundärer anti-mouse-HRP-Antikörperlösung (siehe oben) versetzt. Die Detektion entsprach der eines herkömmlichen Western-Blots (vgl. 4.4.5).

4.4.7 ELISA

Für den *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) wurden die Wells einer ELISA-Platte für 12 h mit einer Protein-PBS-Lösung in der Konzentration von jeweils 3 µg/ml in einem Gesamtvolumen von 100 µl bei 4 °C inkubiert. Für die Immobilisation von FCS wurden 100 µl einer in PBS gelösten 1,5 %igen FCS-Lösung bzw. für die Beschichtung mit PBS 100 µl 1 x PBS-Puffer eingesetzt. Die beschichteten Wells wurden anschließend dreimal mit 1 x PBS-T-Puffer gewaschen und für 90 min mit 100 µl einer primären

Antikörperlösung (siehe unten) inkubiert. Zur Kontrolle wurden ein anti-P5D4-, ein anti-His-Tag-, ein polyklonaler anti-hTSLPR- und der Isotypen-Antikörper IgG1 in der gleichen Konzentration eingesetzt. Danach wurden die Wells erneut dreimal gewaschen, für 1 h mit jeweils 100 µl einer sekundären anti-mouse-HRP- bzw. anti-goat-HRP-Antikörperlösung (siehe unten) versetzt und wiederum dreimal gewaschen. Schließlich wurde jedes Well mit 100 µl eines ELISA-Substratgemisches versetzt. Nach 20 min wurde die enzymatische Umsetzung des Substrates mit 50 µl 2M H_2SO_4 gestoppt und die Absorbanz bei 495 nm bei einer Referenzwellenlänge von 630 nm ermittelt.

primäre Antikörperlösung	1 x PBS; 2 µg/ml primärer Antikörper
sekundäre Antikörperlösung	1 x PBS; HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper im Verhältnis 1 : 1000

4.4.8 Gewinnung und chromatographische Reinigung von Antikörpern aus Hybridoma-Überständen

Die durch Hybridomaklone ins Medium sezernierten Antikörper wurden etwa alle drei Tage gesammelt. Pro 75 cm²-Zellkulturflasche wurden je 50 ml Zellsuspension abgenommen, 5 min bei 6000 x g zentrifugiert und die zellfreie Antikörperlösung bei -20 °C gelagert. Für die Reinigung der Antikörper wurden jeweils 500 ml der Medienüberstände von Hybridoma-Einzelklonen in einer Zeitspanne von 6 h unter ständigem Rühren mit 70 %iger Ammoniumsulfatlösung im Verhältnis 1 : 1 (vol/vol) gefällt. Anschließend wurde das Präzipitat für 15 min bei 7500 x g zentrifugiert und in 50 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 gelöst und nochmals zentrifugiert. Zur Entfernung von Verunreinigungen wurde die Lösung zusätzlich steril filtriert und mithilfe einer 1 ml Protein A-Sepharose-Säule am *Äkta Purifier*® (GE-Healthcare) gemäß den Herstellerangaben chromatographisch gereinigt. Beim Passieren der Säule wurden die Antikörper gebunden. Die zusätzlich in der Lösung enthaltenen Proteine gelangten durch die Säule ohne zu binden und wurden entweder zur weiteren Analyse gesammelt oder verworfen. Die Antikörper wurden durch die kontinuierliche pH-Senkung von pH 7,5 auf pH 3 mittels 100 mM Glycinpuffer eluiert. Um die Antikörper vor Denaturierung durch das saure Milieu zu schützen, wurde das Eluat in 0,5 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 aufgenommen. Anschließend wurden die Antikörper für etwa 12 h bei 4 °C gegen 1 x PBS-Puffer pH 7,2 dialysiert, steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt. Die Reinheit der Antikörper wurde mithilfe eines Coomassie-Gels bestimmt. Die Antikörperkonzentration wurde photometrisch ermittelt.

4.4.9 Konzentrierung von Antikörpern mittels Protein A-Sepharose-Beads

Zur Konzentrierung kleiner Antikörpermengen wurden jeweils 1,5 ml der Medienüberstände von Hybridoma-Einzelklonen mit 50 µl Protein A-Sepharose-Beads versetzt, welche zuvor in 200 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 aufgenommen worden waren. Die Proben wurden für 12 h bei 4 °C auf dem Drehrad vermischt, wobei die Antikörper an die *Beads* banden. Anschließend wurden sie für 5 min bei 7500 x g zentrifugiert und zweimal mit jeweils 1 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer gewaschen. Das Pellet wurde mit 20 µl 100 mM Glycin pH 3 resuspendiert. Auf diese Weise lösten sich die Antikörper von den *Beads*. Danach wurde erneut zentrifugiert und der Überstand umgehend in 10 µl 500 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 neutralisiert. Die konzentrierten Antikörper konnten in dieser Form direkt eingesetzt werden.

4.4.10 FITC-Konjugation monoklonaler Antikörper

In einem Ultrafiltrationsröhrchen wurde eine 2 mg/ml konzentrierte Antikörperlösung mittels Zentrifugation für 15 min bei 7500 x g in 0,5 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 umgepuffert. Aus FITC und DMSO wurde eine 10 mg/ml Fluorophorlösung hergestellt (siehe unten). Die umgepufferten Antikörper wurden in einer Konzentrationsreihe mit unterschiedlichen Mengen der Fluorophorlösung versetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 2 h bei Raumtemperatur in abgedunkelter Umgebung auf dem Schüttler. Bei einer Konzentration von 150 µg FITC/ mg Antikörper war die Konjugation erfolgreich. Die Lösung wurde erneut in dem Ultrafiltrationsröhrchen in 1 x PBS-Puffer pH 7,2 umgepuffert. Aufgrund seines geringen Molekulargewichts wurde das ungebundene FITC bei der Zentrifugation durch die Säule nahezu vollständig entfernt, sodass keine weitere Reinigung nötig war. Die konjugierte Antikörperlösung wurde in Lagerungspuffer (siehe unten) aufbewahrt. Die Funktionalität der Antikörper wurde anschließend zytometrisch analysiert.

Fluorophorlösung	1 mg FITC; 100 µl DMSO
Lagerungspuffer	1 x PBS-Puffer; 1 % BSA (w/v); 0,1 % NaN_3 (w/v)

5 Ergebnisse

5.1 Vorarbeiten und Voraussetzungen für die Gewinnung monoklonaler anti-hTSLPR-Antikörper

Der Einsatz von Antikörpern in der Diagnostik und Therapie verschiedener Krankheitsbilder gewinnt zunehmend an Bedeutung, wie in der Einleitung näher ausgeführt wurde. Ziel dieses Projektes war die Herstellung funktioneller monoklonaler Antikörper gegen die humane TSLPR α -Kette, welche gemeinsam mit der hIL-7R α -Kette an der Bildung des hTSLP-Rezeptors beteiligt ist. Erst seit kurzem wird diesem eine malignitätsrelevante Rolle zugeschrieben, die für den ungünstigen Verlauf bei einigen Fällen der B-ALL von funktioneller Bedeutung zu sein scheint (Yoda et al. 2010). Für die Gewinnung von Antikörpern wurde die Hybridomatechnik angewendet. Wie bereits erläutert wurde, ist die Grundlage für diese Methode die Immunisierung eines Organismus mit einem Antigen, welches später die Zielstruktur der gebildeten Antikörper darstellen soll (Köhler und Milstein 1975). In diesem Projekt wurde die Exodomäne der hTSLPR α -Kette als Zielantigen eingesetzt. Dafür wurden drei *BALB/c*-Mäuse mit dem funktionellen rekombinanten hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein beimpft. Die Immunisierung erfolgte im Universitätsklinikum Rostock durch den Kollaborationspartner Dr. M. Küpper. Das so bezeichnete rekombinante hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein wurde im Vorfeld durch die Etablierung eines Expressionssystems (siehe Abbildung 5.1) in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe in nahezu reiner Form hergestellt (Borowski et al. 2013, Borowski 2012). Das Expressionssystem codiert neben dem hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein weiterhin für die humane IL-4R α -Kette, den P5D4-Tag sowie einen doppelten His-Tag. Die zusätzlich codierten Peptide spielten bei der Gewinnung, Detektion und Reinigung während der Herstellung des hTSLPR α_{ex} -Rezeptorproteins eine Rolle. Die IL-4R α -Kette wurde in ihrer Funktion als Signalpeptid (SP) bei der Ausschleusung des Proteins aus der Trägerzelle abgespalten. Da der P5D4-Tag und der doppelte

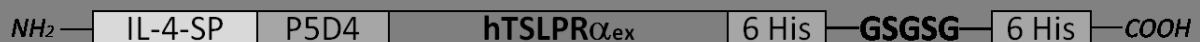


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der rekombinanten hTSLPR-Domäne

Das Konstrukt *pcDNA-pTSLPR α_{ex} -His* codiert für das hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein, die humane IL-4R α -Kette (IL-4-SP), welche als Signalpeptid (SP) dient, für den aus 15 Aminosäuren bestehenden P5D4-Tag und für zwei His-Tags, welche sich jeweils aus 6 Histidinen zusammensetzen und über einen Glycin-Serin-Linker (GSGSG) verbunden sind.

(modifiziert nach (Borowski et al. 2013))

His-Tag mit dem für die Immunisierung verwendeten Zielprotein verbunden waren, musste bei der Durchmusterung der Antikörper berücksichtigt werden, dass sich die gewonnenen Immunglobuline auch gegen diese zusätzlichen Epitope richten konnten. Die im Zuge der natürlichen Immunantwort gebildeten murinen B-Plasmazellen, welche die Antikörper sezernieren, wurden zwei Tage nach der letzten Impfung nach der Splenektomie aus der murinen Milz isoliert. Die B-Plasmazellen wurden anschließend mit X63AG8.653-Myelomzellen fusioniert, wobei sogenannte Hybridomazellen entstanden. Der Vorteil solcher Fusionszellen liegt darin, dass die Eigenschaften aus B-Zellen und Tumorzellen vereint werden. Auf diese Weise werden bei unbegrenzter Proliferation Antikörper sezerniert. Insgesamt fanden drei Fusionen statt. Zur Selektion funktioneller Klone wurden die Hybridomazellen für drei Wochen in Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT)-Medium kultiviert. Die somit erhaltenen Klonmischungen wurden anschließend in Hybridoma-Medium überführt (Borowski et al. 2013). Die Abbildung 5.2 zeigt eine Übersicht der einzelnen Phasen der Gewinnung monoklonaler anti-hTSLPR-Antikörper. Für die funktionellen Analysen und die zytometrische Durchmusterung der sezernierten Antikörper bedurfte es einer Zelllinie mit kontinuierlicher Expression des Zielantigens auf der Zelloberfläche. Für die Identifizierung von anti-hTSLPR-Antikörpern wurde die stabile Zelllinie Ba/F3-hTSLPR verwendet. Diese wurde innerhalb der Arbeitsgruppe aus der mIL-3-abhängigen, murinen pro-B-Zelllinie Ba/F3 generiert (Sebastian 2008). Die Ba/F3-hTSLPR-Zellen exprimieren

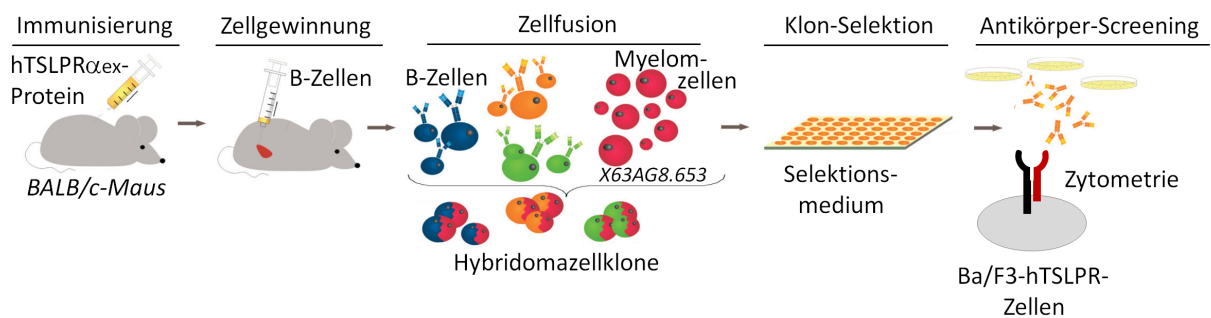


Abbildung 5.2: Gewinnung von anti-hTSLPR-Antikörpern aus Hybridomazellen

Drei *BALB/c*-Mäuse wurden jeweils viermal zu unterschiedlichen Zeitpunkten in einem Zeitraum von 12 Wochen mit 20 – 90 μ g des rekombinanten hTSLPR α_{ex} -Rezeptorproteins immunisiert. Die im Zuge der natürlichen Immunantwort produzierten murinen B-Zellen wurden zwei Tage nach der letzten Impfung aus der murinen Milz isoliert und mit X63AG8.653-Myelomzellen zu Hybridomazellen fusioniert. Funktionelle Klone wurden anschließend in speziellen Medien selektiert. Die Durchmusterung der produzierten Antikörper erfolgte zytometrisch anhand der stabilen Ba/F3-hTSLPR-Zelllinie.

(modifiziert nach (Wohlgemuth und Li 2012))

in rekombinanter Form die humane TSLPR α -Kette sowie die humane IL-7R α -Kette, welche zusammen den funktionellen Rezeptor für humanes TSLP bilden. Beide Ketten weisen zusätzlich das P5D4-Epitop auf. Um die Funktionalität des Rezeptors im Vorfeld der Durchmusterung der Antikörper sicherzustellen, wurde das hTSLP-abhängige Proliferationsvermögen der Ba/F3-hTSLPR-Linie in Form eines MTS-Zellproliferationsassays überprüft (siehe Abbildung 5.3). Dafür wurden die Zellen zunächst in faktorfreiem RFG-Medium starviert und danach in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe mit rhTSLP stimuliert. Anschließend wurde der Grad der Proliferation mittels einer Absorbanzmessung erfasst. Im Ergebnis zeigte die Proliferationskurve einen sigmoidalen Verlauf, was eine hTSLP-Abhängigkeit bestätigte und die Expression eines funktionellen Rezeptors sicherstellte. Die EC_{50} wurde mit dem Programm *Origin*[®] berechnet und lag bei 61,13 ng/ml hTSLP. Demnach eignete sich die Ba/F3-hTSLPR-Linie für die zytometrische Identifizierung von hTSLP-Rezeptor-bindenden Antikörpern.

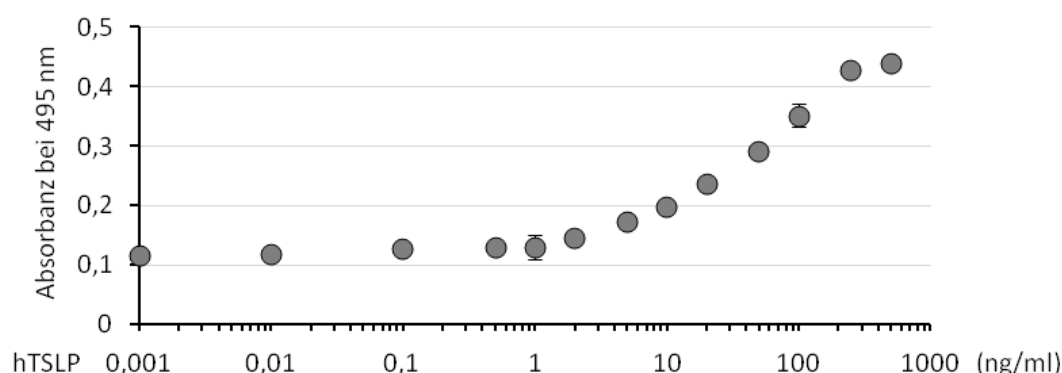


Abbildung 5.3: Proliferation der Ba/F3-hTSLPR-Linie in Abhängigkeit von hTSLP

Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden für 6 h in faktorfreiem RFG-Medium starviert und pro Ansatz etwa 1×10^4 Zellen in einer 96-Well-Platte ausgesät. Danach folgte die Stimulation mit rhTSLP in den angegebenen Konzentrationen. Der Grad der Proliferation wurde nach 72 h mittels *CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* durch eine Absorbanzmessung bei 495 nm gemessen. In dem Test werden mithilfe von *Tetrazoliumsalzen* biologische Reduktionsvorgänge als Maß für die Stoffwechselaktivität metabolisch aktiver Zellen sichtbar gemacht (vgl. 4.2.8). Der Test zeigt einen von zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmung.

5.2 Identifizierung hTSLP-Rezeptor-bindender und -inhibierender Antikörper

5.2.1 Standardverfahren der zytometrischen Analyse

Nachdem die in Vorarbeiten selektierten Hybridomaklon-Mischungen etwa drei Wochen in Kultur gehalten wurden, konnten erste Durchmusterungsversuche der ins Medium sezernierten Antikörper auf ihre Fähigkeit, an den humanen TSLP-Rezeptor zu binden, vorgenommen werden. Die Durchmusterung erfolgte im Durchflusszytometer. Dazu mussten zunächst experimentelle Bedingungen standardisiert werden, um die Versuche nahezu vergleichbar auswerten zu können. Die Optimierung der Einstellungen zur Erfassung der Daten werden im Abschnitt 4.3.2 näher beschrieben. In Vorbereitung auf die zytometrische Analyse wurden Zellen der Ba/F3-hTSLPR-Linie zunächst mit primären Antikörpern aus Hybridoma-Überständen inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS-Puffer wurden sie mit einem sekundären Antikörper versetzt, welcher Bereiche des primären Antikörpers binden und aufgrund seines gekoppelten Fluorophors im Durchflusszytometer detektiert werden kann (siehe Abbildung 5.4). Als Positivkontrolle für alle zytometrischen Messungen wurde ein primärer anti-P5D4-Antikörper eingesetzt, welcher das P5D4-Epitop der exprimierten hTSLPR α -Kette und der hIL-7R α -Kette auf Ba/F3-hTSLPR-Zellen erkennt

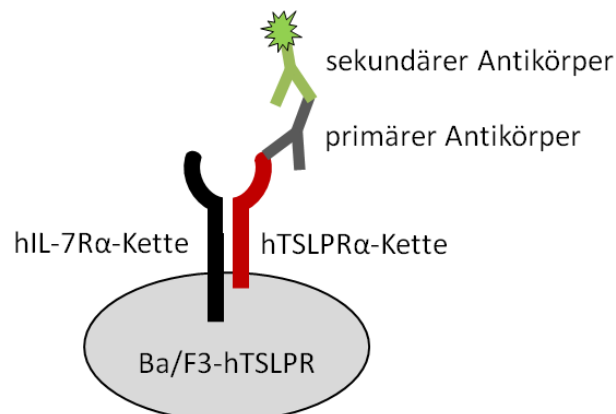


Abbildung 5.4: Antikörper-Bindungsschema an Ba/F3-hTSLPR-Zellen

In Vorbereitung auf die zytometrische Analyse wurden pro Ansatz zunächst etwa 1×10^5 Zellen der Ba/F3-hTSLPR-Linie für 1 h mit einem primären Antikörper inkubiert und anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte für 1 h die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, welcher Bereiche des primären Antikörpers binden und aufgrund seines Fluorophors im Durchflusszytometer detektiert werden kann (vgl. 4.3.1). Als sekundärer Antikörper wurde abhängig von der Verfügbarkeit innerhalb einer Messreihe ein entweder an *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) oder *Phycoerythrin* (PE) gekoppelter anti-mouse-Antikörper verwendet.

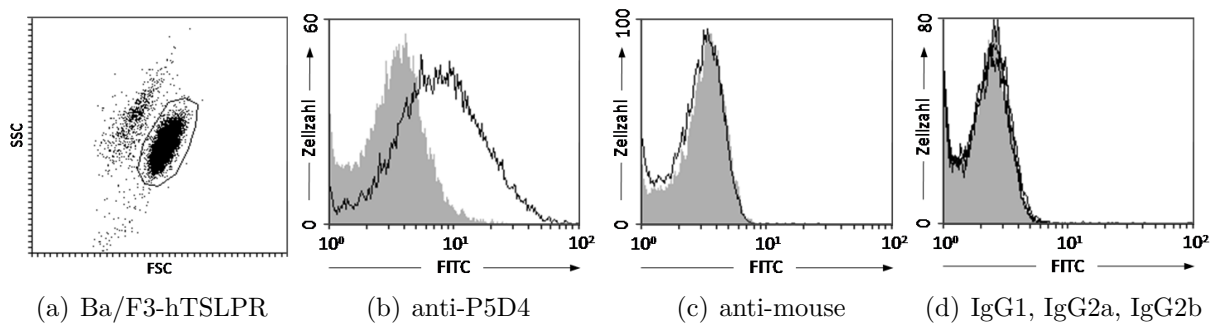


Abbildung 5.5: Darstellung der zytometrischen Kontrollen

Bei zytometrischen Messungen wurde im *FSC-SSC*-Diagramm zunächst ein Analysefenster um ausschließlich vitale Zellen gesetzt (a) und die dazugehörigen Histogramme auf dieses *Gate* eingestellt (vgl. 4.3.2). Als Positivkontrolle diente stets ein anti-P5D4-Antikörper in einer eingesetzten Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ (b). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Ba/F3-hTSLPR-Zellen sowie ausschließlich mit sekundärem, in diesem Beispiel FITC-gekoppeltem anti-mouse-Antikörper im Verhältnis 1 : 50 inkubierte Zellen (grau) (c). Zur Untersuchung möglicher unspezifischer Signale wurden Kontrollen mit den Isotypen-Antikörpern IgG1, IgG2a, IgG2b in einer Verdünnung von 1 : 10 durchgeführt (d).

und demnach stets ein starkes Signal lieferte. Die Negativkontrollen bestanden aus Ba/F3-hTSLPR-Zellen, welche lediglich den Waschschritten unterzogen worden waren, sowie aus nur mit sekundärem Antikörper inkubierten Zellen. Letztere sind in jedem folgenden Histogramm als graue Fläche abgebildet, auf die Darstellung des Hintergrundsignals unbehandelter Zellen wurde verzichtet. Als sekundärer Antikörper wurde abhängig von der Verfügbarkeit in äquivalenter Weise ein entweder an *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) oder *Phycoerythrin* (PE) gekoppelter anti-mouse-Antikörper verwendet. Zur weiteren Spezifitätskontrolle wurden die Zellen in einigen Experimenten mit den primären Isotypen-Antikörpern IgG1, IgG2a und IgG2b inkubiert. Für die Untersuchungen wurde zunächst die vitale Ba/F3-hTSLPR-Population im *FSC-SSC*-Diagramm mittels eines Analysefensters (*Gate*) festgelegt, um unspezifische Bindungen an toten Zellen auszuschließen. In Abbildung 5.5 werden beispielhaft die Kontrollen einer zytometrischen Analyse gezeigt.

5.2.2 Zytometrische Durchmusterung von Antikörpern aus Hybridoma-Kulturüberständen

Aus drei unabhängigen Hybridomafusionen wurden etwa 100 polyklone Hybridomakulturen gewonnen, von denen etwa 70 der Analyse im Durchflusszytometer zugeführt wurden. Nach der Optimierung des zytometrischen Messverfahrens wurden die durch die polyklonen Hybridomakulturen sezernierten Antikörper auf ihre Bindungseigenschaften bezüglich des

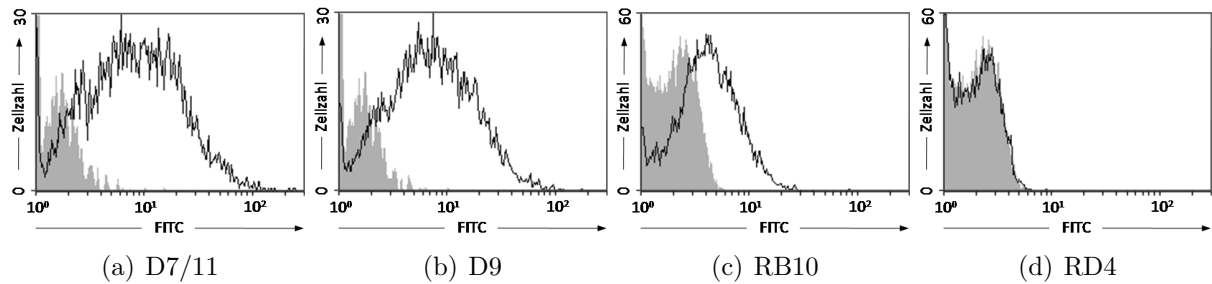


Abbildung 5.6: Zytometrische Analyse polykloner Hybridoma-Überstände

Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden mit 100 – 200 μ l zellfreien Überständen aus polyklonalen Hybridomakulturen wie in Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5 beschrieben inkubiert und analysiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-gekoppelter anti-mouse-Antikörper verwendet. Dargestellt sind die Signale dreier Klonmischungen mit bindenden Antikörpern (a–c) und eine Klonmischung mit nicht-bindenden Antikörpern (d).

hTSLP-Rezeptors untersucht. Dafür wurden Ba/F3-hTSLPR-Zellen mit zellfreien Hybridoma-Überständen und einem sekundären Antikörper inkubiert. Von allen analysierten Überständen wiesen drei Antikörper mit positiven Bindungssignalen auf (siehe Abbildung 5.6). Im Anschluss wurden die drei entsprechenden Kulturen expandiert und jeweils zweimal subkloniert. Die Vereinzelung wurde auf 96-Well-Platten nach der *limiting dilution*-Methode durchgeführt, die einer konventionellen Verdünnungsreihe entspricht (Luttmann et al. 2009). Ziel war es, ausnahmslos Hybridoma-Einzelklone zu erhalten, welche monoklonale, spezifisch bindende Antikörper produzierten. Nach der ersten Vereinzelung wurden die im rechten unteren Quadranten der Mikrotiterplatte gewachsenen Kolonien auf neuen Platten ein zweites Mal zu monoklonalen Kolonien subkloniert. Wiederum nur die im rechten unteren Bereich wachsenden Einzelklone wurden schließlich entnommen und weiter kultiviert (vgl. 4.2.6). Das Verfahren impliziert jedoch, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit mehrere Klone gewonnen werden, die jeweils aus einem identischen Ursprungsclon stammen. Aus den drei Hybridomafusionen konnten insgesamt 245 Einzelklone isoliert werden. Aufgrund der erhöhten Stoffwechselaktivität der sich teilenden und wachsenden Zellen erfolgte in Kultur eine pH-Verschiebung ins Saure, welche durch den im Kulturmedium enthaltenen pH-Indikator in Form einer gelben Verfärbung des Mediums angezeigt wurde. Sobald die Medienüberstände der Hybridoma-Einzelklone eine charakteristische Gelbfärbung annahmen, wurden sie entnommen und die darin enthaltenen Antikörper mithilfe der Ba/F3-hTSLPR-Linie bezüglich ihrer Bindungseigenschaften nach dem bereits beschriebenen Verfahren im Durchflusszytometer analysiert. Dabei zeigten die Antikörper von etwa 186 Einzelklonen positive Bindungssignale. In Abbildung 5.7 werden auszugsweise die Ergebnisse der zytometrischen Messungen gezeigt.

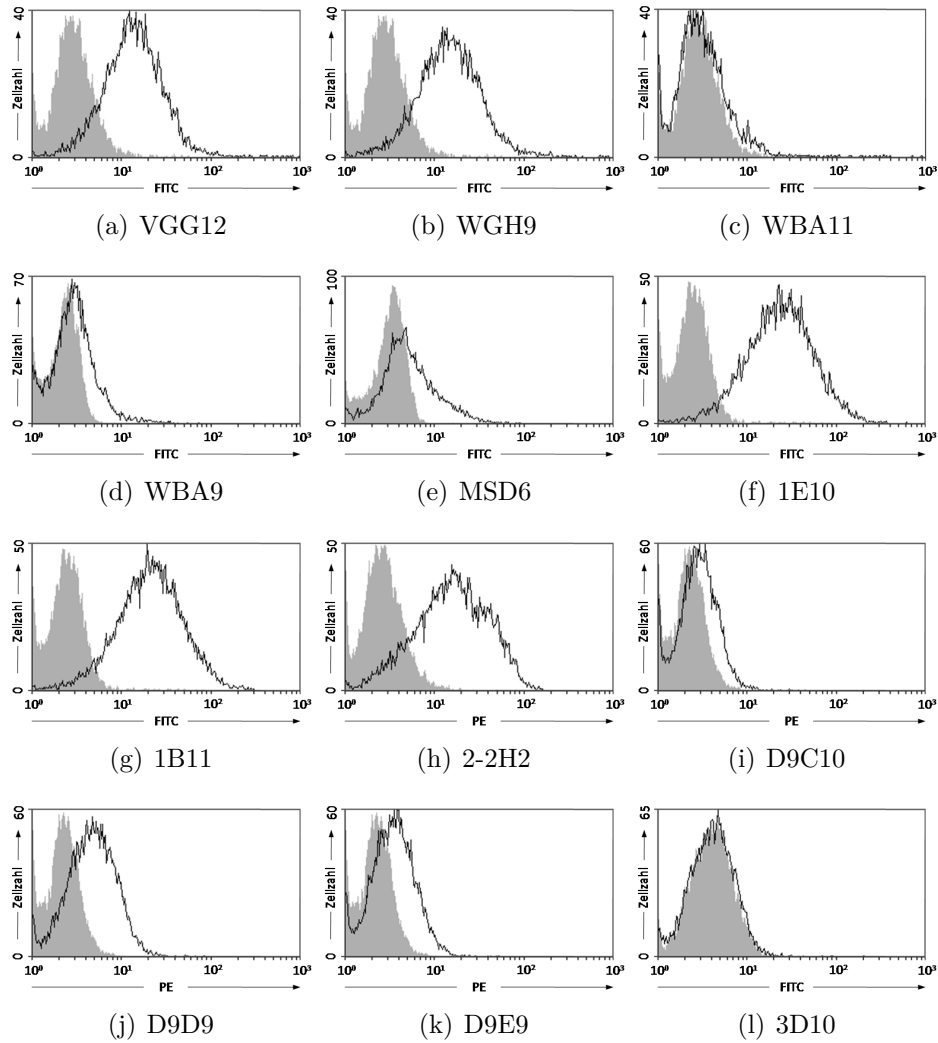


Abbildung 5.7: Zytometrische Analyse von Hybridoma-Einzelklon-Überständen

Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden mit jeweils 100 – 200 μ l zellfreien Überständen von Hybridoma-Einzelklonen wie in Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5 beschrieben inkubiert und analysiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC- oder PE-gekoppelter anti-mouse-Antikörper verwendet. Dargestellt sind die Signale von bindenden monoklonalen Antikörpern (a–k) und ein Beispiel für einen nicht-bindenden monoklonalen Antikörper (l).

5.2.3 Vorversuche zur Spezifitätskontrolle zum Ausschluss P5D4-bindender Antikörper

Da die Immunisierung der *BALB/c*-Mäuse mit dem hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein vorgenommen wurde, welches unter anderem auch das P5D4-Epitop enthielt (vgl. 5.1), war die Wahrscheinlichkeit beträchtlich, dass sich unter den Antikörpern der Überstände von Hybridoma-Einzelklonen neben hTSLPR- auch P5D4-Binder befanden. Angesichts der

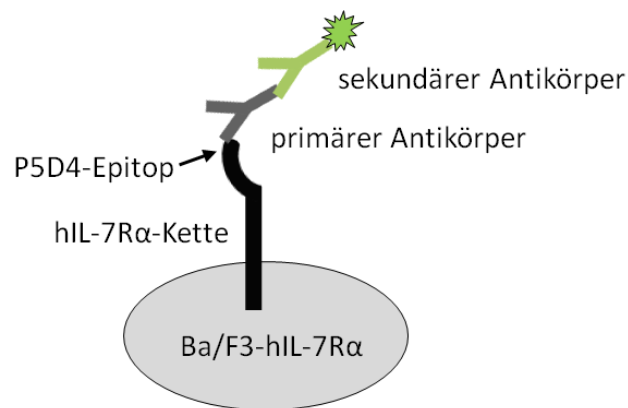


Abbildung 5.8: Schema monoklonaler anti-P5D4-Binder an Ba/F3-hIL-7Rα-Zellen
 Für die Identifizierung P5D4-bindender Antikörper wurden mIL-3-abhängige Ba/F3-Zellen für 6 h starviert und mit dem Konstrukt *pcDNA3.1hIL-7Rα* (Wohlmann et al. 2010) transfiziert. Dieses codiert für die hIL-7Rα-Kette, welche ein P5D4-Epitop enthält. Die transfizierten Zellen wurden für 12 h kultiviert, um die Oberflächenexpression der Kette zu ermöglichen. Anschließend folgte die Inkubation mit Überständen von Hybridoma-Einzelklonen und einem sekundären Antikörper wie in Abbildung 5.4 beschrieben. Die Proben wurden anschließend zytometrisch analysiert.

Tatsache, dass auch die für die zytometrische Durchmusterung der Antikörper verwendete Ba/F3-hTSLPR-Zelllinie P5D4-Epitope als Bestandteil beider Ketten des hTSLP-Rezeptors exprimiert, konnte bei den detektierten Antikörper-Bindungssignalen nicht unterschieden werden, ob diese von der Erkennung der hTSLPα-Kette oder der P5D4-Epitope herrührten. Um P5D4-bindende Antikörper ausfindig zu machen, wurden zytometrische Vorversuche mithilfe von transient transfizierten Ba/F3-hIL-7Rα-Zellen durchgeführt, wie in Abbildung 5.8 schematisch dargestellt. Die Transfektion erfolgte mit mIL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen, welche zunächst von ihrem Wachstumsfaktor freigesprochen und starviert wurden. Anschließend wurde das für die hIL-7Rα-Kette codierende Plasmid *pcDNA3.1hIL-7Rα* (Wohlmann et al. 2010) transfiziert und die Zellen zur Anregung der hIL-7Rα-Ketten-Oberflächenexpression in Kultur genommen. Um den Grad der Proteinexpression und somit den Transfektionserfolg abzuschätzen, wurde bei der zytometrischen Messung als Positivkontrolle erneut der anti-P5D4-Antikörper eingesetzt. Die transfizierten Ba/F3-hIL-7Rα-Zellen wurden anschließend mit den Medienüberständen der Hybridoma-Einzelklone und danach mit einem sekundären Antikörper inkubiert. Die Abbildung 5.9 zeigt auszugsweise die Ergebnisse der zytometrischen Analyse einiger Einzelklon-Überstände. Antikörper mit einem Bindungssignal von $> 3\%$ (vgl. 4.3.3), wobei die Grenze willkürlich gesetzt wurde, wurden als P5D4-Binder eingeschätzt und von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Mit dieser Methode konnte die Anzahl der Einzelklone auf etwa 100 reduziert werden.

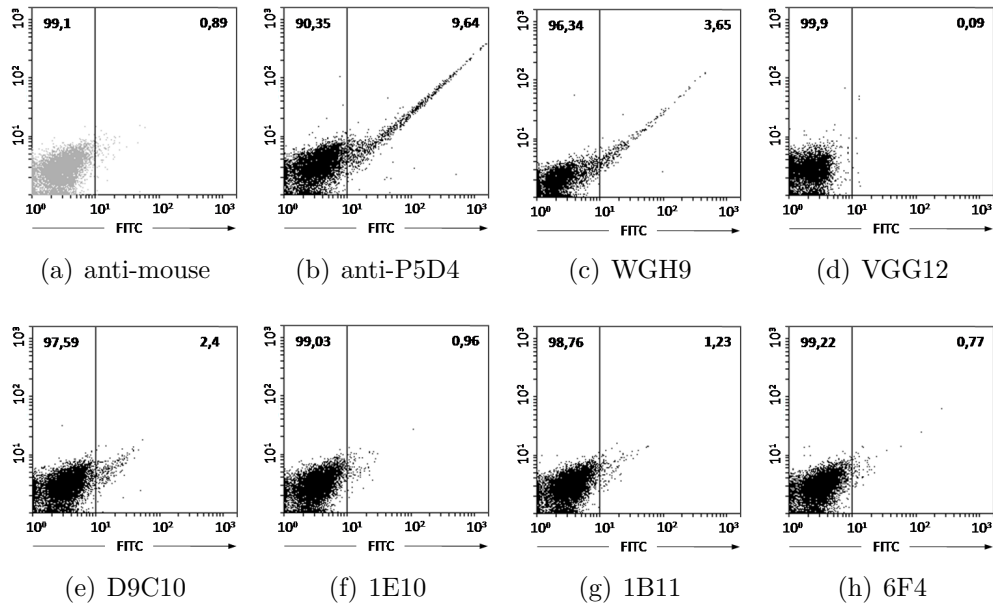


Abbildung 5.9: Vorversuche zur Identifizierung P5D4-Epitop-bindender Antikörper
 Transfizierte Ba/F3-hIL-7R α -Zellen wurden jeweils mit 100 – 200 μ l Medienüberständen von Hybridoma-Einzelklonen inkubiert, deren Antikörper bereits Bindungssignale an Ba/F3-hTSLPR-Zellen gezeigt hatten. Die Negativkontrolle bestand aus nur mit sekundärem, FITC-gekoppeltem Antikörper inkubierten Zellen (a), als Positivkontrolle wurde ein anti-P5D4-Antikörper eingesetzt (b). Die zytometrischen Messungen wurden in Form von *Dot-Plots* ausgewertet, da auch schwache Signale in dieser Darstellung eindeutiger identifiziert werden konnten. (c) zeigt beispielhaft einen P5D4-bindenden Antikörper, in (d–j) wird die zytometrische Analyse einiger nicht an das P5D4-Epitop bindender Antikörper gezeigt.

5.2.4 Identifizierung von Antikörpern mit Bindung an denaturiertes hTSLP-Rezeptorprotein

Die bei der zytometrischen Durchmusterung identifizierten anti-hTSLPR-Antikörper, die den nativen hTSLP-Rezeptor auf Ba/F3-hTSLPR-Zellen zu erkennen vermochten, wurden zusätzlich auf ihre Fähigkeit, den hTSLP-Rezeptor in denaturierter Form zu binden, untersucht. Dafür wurden die Überstände von 27 Hybridoma-Einzelklonen analysiert, deren Antikörper bezüglich der Bindung an Ba/F3-hTSLPR-Zellen ein besonders starkes, konstantes Signal hervorgerufen (vgl. 5.2.2) und in ersten Spezifitätstests keine Bindung an das P5D4-Epitop gezeigt hatten (vgl. 5.2.3). Die Durchmusterung erfolgte zunächst in Vorversuchen mithilfe sogenannter *Dot-Blots*, einer abgewandelten Form des Western-Blots. Dafür wurde das hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein, welches im Vorfeld bereits in nativer Form als Antigen für die Immunisierung der *BALB/c*-Mäuse diente (vgl. 5.1), auf kleinen Nitro-

zellulosemembranen fixiert. Diese wurden mit Hybridoma-Überständen der entsprechenden Einzelklone inkubiert und detektiert. Als Positivkontrolle wurde ein anti-P5D4-Antikörper eingesetzt, die Negativkontrollen bestanden aus einer Leerprobe ohne Protein und aus einer mit ausschließlich sekundärem, HRP-gekoppeltem anti-mouse-Antikörper behandelten Membran. Von den 27 Einzelklonen wurden 15 ausgewählt, deren Antikörper im Dot-Blot eine Bindung an das denaturierte Protein zeigten, wie in Abbildung 5.10(a) beispielhaft gezeigt wird. Um die Signale der entsprechenden Antikörper zu verifizieren, wurde anschließend eine Western-Blot-Detektion durchgeführt. Das hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein wurde zunächst in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die in Streifen geschnittenen Einzelmembranen wurden jeweils mit den zu untersuchenden Einzelklon-Überständen inkubiert. Als Positivkontrolle diente erneut der anti-P5D4-Antikörper (siehe Abbildung 5.10(b)). Im Ergebnis konnten zwei Antikörper (VGG12, D9C10) identifiziert werden, welche Bindungssignale zeigten.

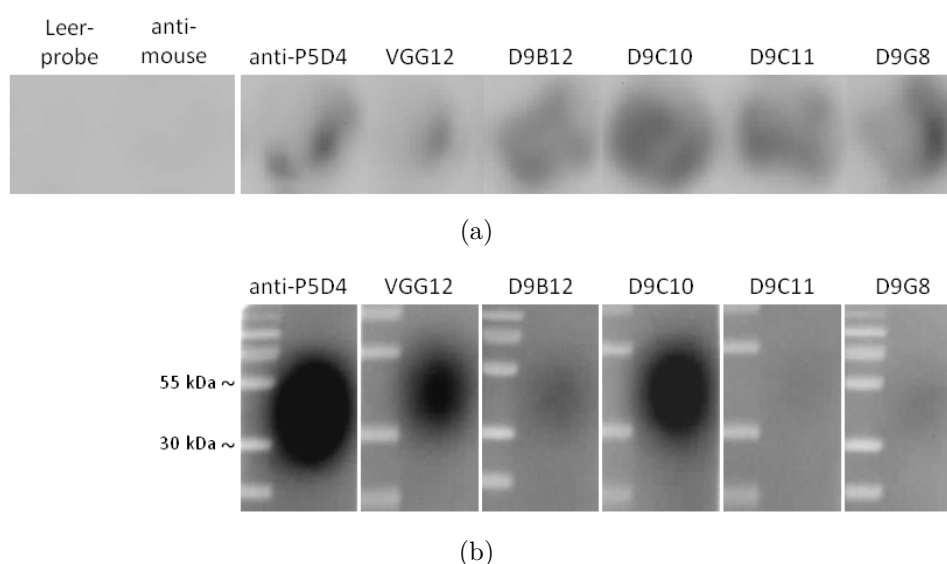


Abbildung 5.10: Identifizierung Western-Blot geeigneter anti-hTSLPR-Antikörper

(a) Für den Dot-Blot wurden jeweils 100 ng des rekombinanten hTSLPR α_{ex} -Rezeptorproteins (vgl. 5.1) tropfenweise auf kleinen Nitrozellulosemembranen fixiert. Die anschließend geblockten Membranen wurden mit jeweils 800 μ l der Einzelklon-Überstände inkubiert und danach detektiert (vgl. 4.4.6). Als Positivkontrolle wurde ein anti-P5D4-Antikörper in einer Konzentration von 1 μ g/ml eingesetzt. Die Negativkontrollen bestanden aus einer Leerprobe ohne Protein und aus einer nur mit sekundärem, HRP-gekoppeltem anti-mouse-Antikörper inkubierten Membran. Beispielhaft werden die Signale einiger untersuchter Einzelklon-Antikörper dargestellt. (b) In einem 12,5 %igen SDS-Gel wurden abwechselnd Proteinmarker und 500 ng des denaturierten hTSLPR α_{ex} -Rezeptorproteins aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen geblottet und diese in Streifen geschnitten. Jede Einzelmembran wurde mit 10 ml des Einzelklon-Überstandes inkubiert und detektiert (vgl. 4.4.5). Als Positivkontrolle diente ebenfalls ein anti-P5D4-Antikörper.

5.2.5 Identifizierung von anti-hTSLPR-Antikörpern mit inhibitorischen Eigenschaften

Die etwa 100 Antikörper, welche ein Bindungssignal an Ba/F3-hTSLPR-Zellen gezeigt hatten (vgl. 5.2.2) und in den zytometrischen Spezifitätskontrollen nicht als mögliche P5D4-Binder eingestuft worden waren (vgl. 5.2.3), wurden mithilfe von Reporterassays auf inhibitorische Eigenschaften bezüglich des hTSLP-Rezeptors durchgemustert. Das Prinzip dieser Messung beruht auf einer transkriptionellen Aktivierung eines in hTSLPR⁺ Zellen transfizierten Reportergens, welche durch Transkriptionfaktoren über den vorgeschalteten Promotor hervorgerufen wird. In diesem Assay wurde das Luciferase-Reporter-Konstrukt *pGL3-SOCS3* (Wohlmann et al. 2010) transient in Ba/F3-hTSLPR-Zellen transfiziert. Das Konstrukt wird theoretisch nach einer Stimulierung des hTSLP-Rezeptors durch das Zytokin hTSLP über den Tyrosin-phosphorylierten Transkriptionsfaktor STAT3 spezifisch aktiviert. Im Zuge der Umsetzung des zugeführten Substrates *Luciferin* durch das expri-

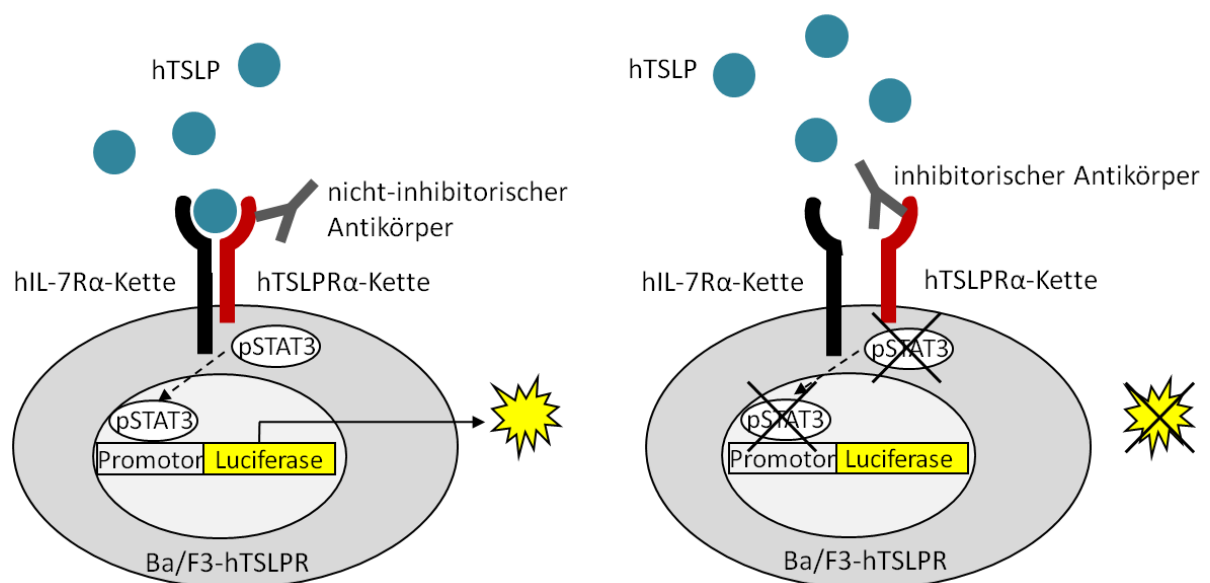


Abbildung 5.11: Transkriptionelle Reporteraktivierung in Ba/F3-hTSLPR

Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden mit dem STAT3-Reporter-Konstrukt *pGL3-SOCS3* (Wohlmann et al. 2010) transient transfiziert und etwa 5×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Platte eingesät. Danach wurden die Ansätze mit 50 µl Antikörperlösung vorinkubiert, wobei entweder konzentrierte Antikörper aus Hybridoma-Überständen (vgl. 4.4.8) oder gereinigte Antikörper in verschiedenen Konzentrationen angewendet wurden. Die Zellen wurden nach 1 h mit 300 pg/ml rhTSLP stimuliert und für 16 h kultiviert (vgl. 4.2.10). Das Zytokin hTSLP bewirkt eine Aktivierung des Reporter-Konstrukts und initiiert die Expression der *Firefly-Luciferase* (a) oder wird idealerweise durch inhibitorische Antikörper daran gehindert (b).

mierte Enzym *Luciferase* entsteht ein Lumineszenzsignal, welches quantifiziert werden kann. Inhibitoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch ihre Bindung an den Rezeptor die Zugänglichkeit für Substrate verhindern und die Aktivierung nachfolgender Signalwege aufheben (vgl. 2.4). Ein verringertes Lumineszenzsignal wäre demnach Ausdruck einer Blockierung des hTSLP-Rezeptors durch einen inhibitorischen anti-hTSLPR-Antikörper, wie in Abbildung 5.11 schematisch dargestellt wird. Für die Reportergenanalyse wurden die transfizierten Ba/F3-hTSLPR-Zellen zunächst mit Einzelklon-Überständen inkubiert (Daten nicht gezeigt). Der direkte Einsatz von Medienüberständen führte allerdings zu keinem reproduzierbaren Resultat. Da eine chromatographische Reinigung aller zu untersuchenden Antikörper nicht möglich war, wurden diese aus Einzelklon-Überständen unter Zuhilfenahme von Protein A-beschichteten Sepharose-Beads konzentriert (vgl. 4.4.8) und anschließend für den Inhibitionstest eingesetzt. Die Antikörpermenge in dem angegebenen Volumen konnte ausgehend von anderen chromatographischen Reinigungen von Hybridoma-Medienüberständen und der darauffolgenden Konzentrationsbestimmung auf etwa 7,5 – 10 µg geschätzt werden (Daten nicht gezeigt). Mittels dieser Methode wurden schließlich drei Antikörper (1E10, 1B11, 6F4) identifiziert, welche im Reportergenassay zu einer um 50 – 70 % verminderten Luciferaseaktivität führten (siehe Abbildung 5.12).

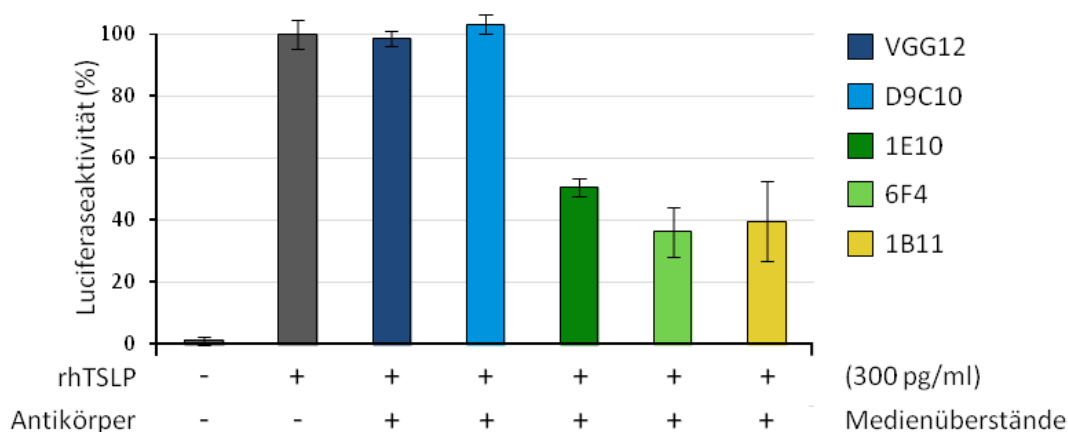


Abbildung 5.12: Untersuchung von anti-hTSLPR-Antikörpern auf inhibitorische Eigenschaften im Reportergenassay

Die Inhibitionstests wurden in Form von Reportergen-Mono-Assays mithilfe des *Luciferase-Assay-System-Kits* (Promega) durchgeführt. Die Reportergen-transfizierten Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden mit konzentrierten Antikörpern aus Hybridoma-Medienüberständen inkubiert und mit 300 pg/ml rhTSLP stimuliert (vgl. Abbildung 5.11). Nach etwa 16 h wurden die Zellen für 15 min lysiert und anschließend mit dem Substrat *Luciferin* versetzt, welches durch die exprimierte Luciferase zu *Oxyluciferin* umgesetzt wird, dessen Lichtemission luminometrisch erfasst wurde (vgl. 4.2.10). Die Werte in % beziehen sich jeweils auf die unstimulierte Probe (0 %) und die ausschließlich mit hTSLP stimulierte Positivkontrolle (100 %). Die Ergebnisse zeigen einen von zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmung.

5.2.6 Resümee

Aus den drei Hybridomafusionen konnten durch Subklonierung etwa 100 Einzelklone gewonnen werden, deren Antikörper Bindungseigenschaften bezüglich der Ba/F3-hTSLPR-Linie zeigten und durch zytometrische Vortests als P5D4-Binder ausgeschlossen werden konnten. Die Erprobung der 27 stärksten Binder auf ihre Eignung, denaturiertes hTSLP-Rezeptorprotein zu erkennen, identifizierte VGG12 und D9C10 als potentielle Western-Blot geeignete Antikörper. Bei der Untersuchung der 100 bindenden Antikörper auf inhibitorische Eigenschaften konnten die drei potentiellen Inhibitoren 1E10, 6F4 und 1B11 ausfindig gemacht werden. Anschließend wurden die identifizierten Antikörper näher charakterisiert.

5.3 Charakterisierung der anti-hTSLPR-Antikörper

5.3.1 Expansion und Reinigung identifizierter anti-hTSLPR-Antikörper

Die Antikörper der Hybridoma-Einzelklone konnten durch die zytometrische Analyse, durch Western-Blot-Detektionen und Reportergenassays zahlenmäßig auf die fünf Antikörper VGG12, D9C10, 1E10, 6F4 und 1B11 mit Bindungseigenschaften bezüglich des hTSLP-Rezeptors reduziert werden. Um eine genauere Charakterisierung vornehmen zu können, war die Konzentrierung und Reinigung dieser Antikörper essentiell. Die Kulturen der entsprechenden Hybridoma-Einzelklone wurden auf jeweils 10 Zellkulturflaschen ausgedehnt und pro Klon etwa 500 ml Medienüberstand mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gefällt. Mithilfe der Säulenaффinitätschromatographie wurden die Antikörper an eine Protein A-Sepharose-Säule gebunden und durch eine kontinuierliche pH-Minderung eluiert (vgl. 4.4.8). Anschließend wurden sie gegen PBS dialysiert und steril filtriert. Die Reinheit der Antikörper wurde durch Coomassie-Gele ermittelt und betrug nach nahezu allen Reinigungsdurchläufen > 99 % (Daten nicht gezeigt). Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration konnten die Antikörper für weitere Versuche verwendet werden. Aus etwa 200 ml Hybridoma-Überstand konnte stets etwa 1 mg Antikörper gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Um eine mögliche Schädigung der Proteine durch den pH-Shift bei der Elution auszuschließen, folgte auf jede Antikörperreinigung nochmals die zytometrische Überprüfung der Antikörper-Bindungseigenschaften an Ba/F3-hTSLPR-Zellen. Dafür wurden die Zellen in getrennten Ansätzen einerseits mit 1 µg gereinigtem Antikörper, andererseits mit 200 µl Medienüberstand desselben Klons inkubiert und vergleichend zytometrisch analysiert (Daten nicht gezeigt). Wenn die Signale äquivalent waren bzw.

der gereinigte Antikörper ein stärkeres Bindungssignal zeigte, konnte eine Schädigung der Antikörper während des Reinigungsprozesses ausgeschlossen werden.

5.3.2 Spezifitätstests mittels ELISA

Erste Spezifitätstests zum Ausschluss P5D4-Epitop-bindender Antikörper wurden bereits mithilfe zytometrischer Analysen durchgeführt (vgl. 5.2.3). Mittels ELISA wurde schließlich die Bindungsspezifität der fünf gereinigten anti-hTSLPR-Antikörper VGG12, D9C10, 1E10, 6F4 und 1B11 überprüft. Dabei sollte eine Bindung an das P5D4-Epitop, den His-Tag, FCS und PBS ausgeschlossen werden. Die ELISA-Platten wurden mit dem rekombinanten hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein und den genannten Antigenen beschichtet (vgl. 4.4.7) und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Zur Kontrolle wurden ein anti-P5D4-, ein anti-His-Tag-, ein kommerziell erworbener polyklonaler anti-hTSLPR- und der Isotypenkontroll-Antikörper IgG1 eingesetzt. Mithilfe eines HRP-gekoppelten, sekundären Antikörpers, welcher die Umsetzung eines HRP-spezifischen Substrates bewirkt,

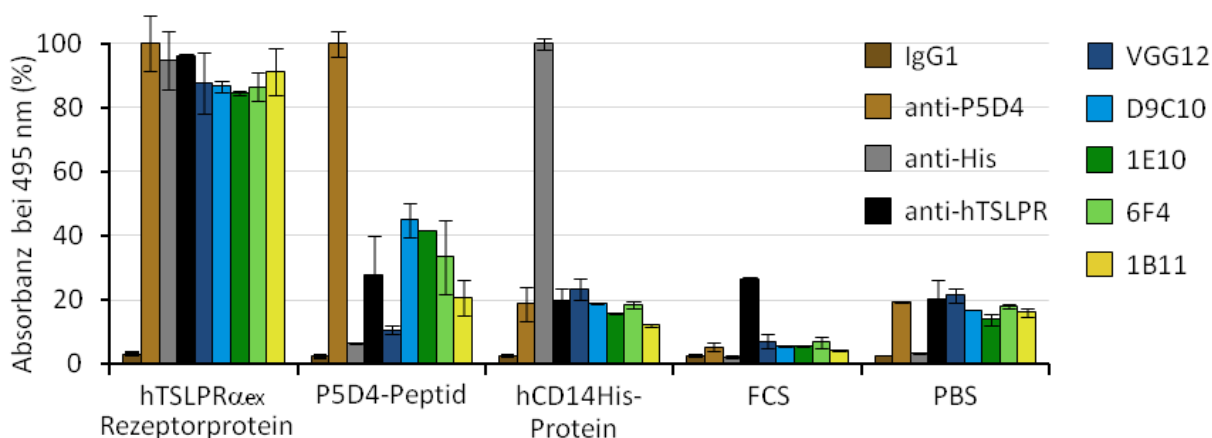


Abbildung 5.13: Antikörper-Spezifitätstest mittels ELISA

Die ELISA-Platten wurden mit dem hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein, einem rekombinanten P5D4-Peptid und dem His-Tag-enthaltenden Protein *hCD14His* in einer Konzentration von jeweils 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei 4 °C beschichtet. Für die Immobilisation von FCS und PBS wurde eine 1,5 %ige FCS-Lösung bzw. PBS-Puffer verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T-Puffer wurden die Wells für 1,5 h mit einer 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Antikörperlösung inkubiert, wobei zu Kontrollzwecken auch ein anti-P5D4-, ein anti-His-, der Isotypen-Antikörper IgG1 und ein polyklonaler anti-hTSLPR-Antikörper eingesetzt wurden. Die Inkubation mit dem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper erfolgte für 1 h in einer Verdünnung von 1 : 2000. Die enzymatische Umsetzung des ELISA-Substratgemisches wurde nach 20 min mit 2M H_2SO_4 gestoppt und die Absorbanz bei 495 nm bei einer Referenzwellenlänge von 630 nm ermittelt (vgl. 4.4.7). Die Signalstärke in % bezieht sich jeweils auf das maximale Signal der Positivkontrolle (100 %). Die Ergebnisse repräsentieren Doppelbestimmungen.

konnten die Antikörper-Bindungssignale durch eine Absorbanzmessung ermittelt werden. In Abbildung 5.13 werden die Ergebnisse der Messung gezeigt. Die fünf gereinigten Antikörper erkannten das hTSLP-Rezeptorprotein und zeigten keinerlei Bindung an den His-Tag, FCS oder PBS. Bezüglich des P5D4-Epitops wiesen im Verhältnis zur Positivkontrolle (100 %) D9C10 zu 45 %, 1E10 zu 41,72 %, 6F4 zu 33,44 % und der polyklonale anti-hTSLPR-Antikörper zu 27,58 % unspezifische Bindungen auf. Da die Signale jedoch weitaus schwächer ausfielen als die des anti-P5D4-Antikörpers, die genannten Antikörper auch im Vorfeld keinerlei Bindung an Ba/F3-hIL-7R α -Zellen gezeigt hatten (vgl. Abbildung 5.9) und auch der kommerziell erworbene Antikörper unspezifisch band, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Antikörpern nicht um P5D4-Binder handelte.

5.3.3 Vergleich von anti-hTSLPR-Antikörpern in der Durchflusszytometrie

Unter den gereinigten Antikörpern VGG12, D9C10, 1E10, 6F4 und 1B11 wurde der potenteste monoklonale anti-hTSLPR-Antikörper für die Durchflusszytometrie bestimmt. Dafür wurden Ba/F3-hTSLPR-Zellen mit den genannten Antikörpern inkubiert und die Bindungssignale nach dem Standardverfahren vergleichend zytometrisch analysiert, wie in Abbildung 5.14(a–b) gezeigt wird. Dabei lieferte VGG12 stets das beste Bindungssignal. Zwischenzeitlich waren zwei monoklonale und ein polyklonaler anti-hTSLPR-Antikörper auf dem Markt verfügbar, welche ebenfalls hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften mit VGG12 verglichen wurden, wie in Abbildung 5.14(c–d) dargestellt. Da die verwendeten kommerziellen monoklonalen Antikörper an *Phycoerythrin* gekoppelt waren, wurde für die Messungen ein PE-konjugierter sekundärer anti-mouse-Antikörper eingesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Im Test zeigte VGG12 sowohl gegenüber den kommerziellen monoklonalen Antikörpern als auch gegenüber dem polyklonalen Antikörper vergleichbare Bindungssignale, was erstaunlich ist, da monoklonale Antikörper meist aufgrund ihrer Bindung an lediglich ein Epitop meist geringere Signale liefern als polyklonale Antikörper, welche ihrerseits an verschiedene Epitope binden. Die Analysen bestätigten die Eignung des monoklonalen Antikörpers VGG12 für weitere zytometrische Messungen zur Detektion des humanen TSLP-Rezeptors. Da der VGG12-Hybridomaklon darüber hinaus eine stabile Proliferation über mehrere Monate aufzeigte, war dieser besonders für die Produktion präparativer Mengen an Antikörpern geeignet.

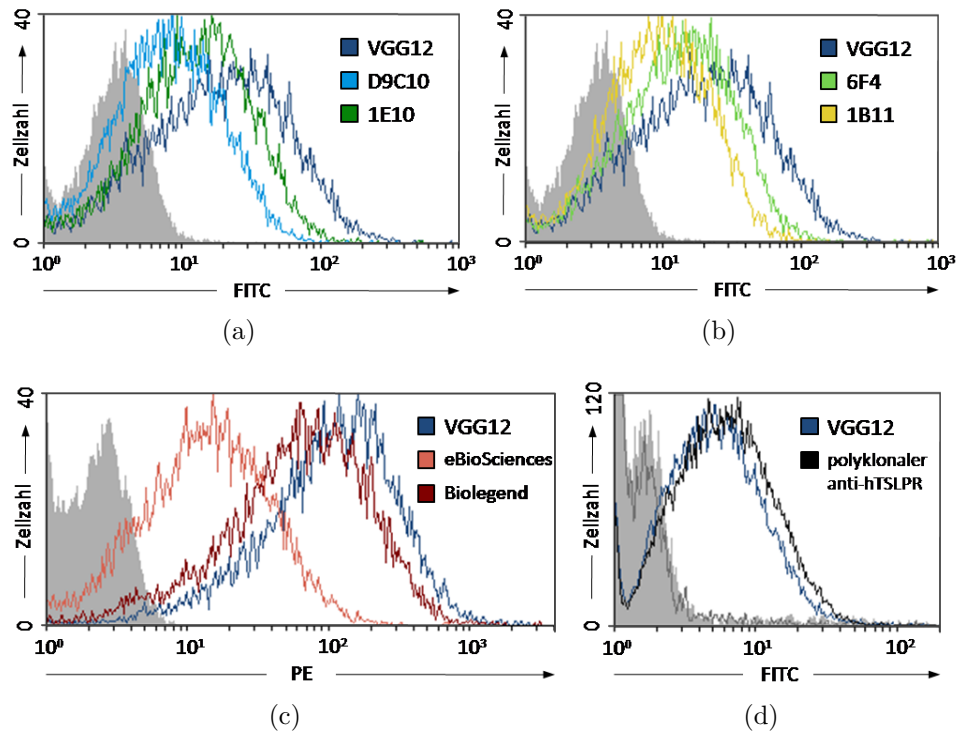


Abbildung 5.14: Zytometrischer Vergleich von anti-hTSLPR-Antikörpern

Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden mit jeweils 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ primärem Antikörper inkubiert und nach dem Standardverfahren zytometrisch vergleichend analysiert (vgl. 5.4). In (a–b) sind die Bindungssignale der gereinigten Antikörper VGG12, D9C10, 1E10, 6F4 und 1B11 im Vergleich gezeigt. In (c) sind die Bindungssignale zweier direkt an *Phycoerythrin* gekoppelter monoklonaler anti-hTSLPR-Antikörper (eBioscience, Biolegend) denen des Antikörpers VGG12 gegenübergestellt. Als sekundärer Antikörper wurde ein PE-gekoppelter anti-mouse-Antikörper eingesetzt. (d) Beim Vergleich mit dem polyklonalen anti-hTSLPR-Antikörper (R & D Systems) wurde für diesen ein sekundärer FITC-konjugierter anti-goat-, für VGG12 ein FITC-konjugierter anti-mouse-Antikörper verwendet.

5.3.4 Charakterisierung gereinigter anti-hTSLPR-Antikörper im Western-Blot

Die identifizierten anti-hTSLPR-Antikörper VGG12 und D9C10 (vgl. 5.2.4) wurden unter dem Einsatz äquivalenter Antikörperkonzentrationen bezüglich ihrer Bindung an denaturiertes hTSLP-Rezeptorprotein mittels Western-Blot-Detektionen vergleichend untersucht. Dafür wurde erneut das hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und die Einzelmembranstreifen mit den genannten Antikörpern und dem kommerziellen polyklonalen anti-hTSLPR-Antikörper inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der anti-P5D4-Antikörper in der gleichen Konzentration eingesetzt. Eine nur mit sekundärem Antikörper versetzte Membran diente als Negativkontrolle (siehe Abbildung 5.15).

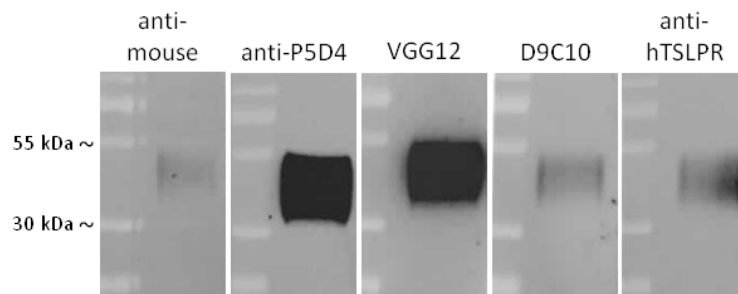


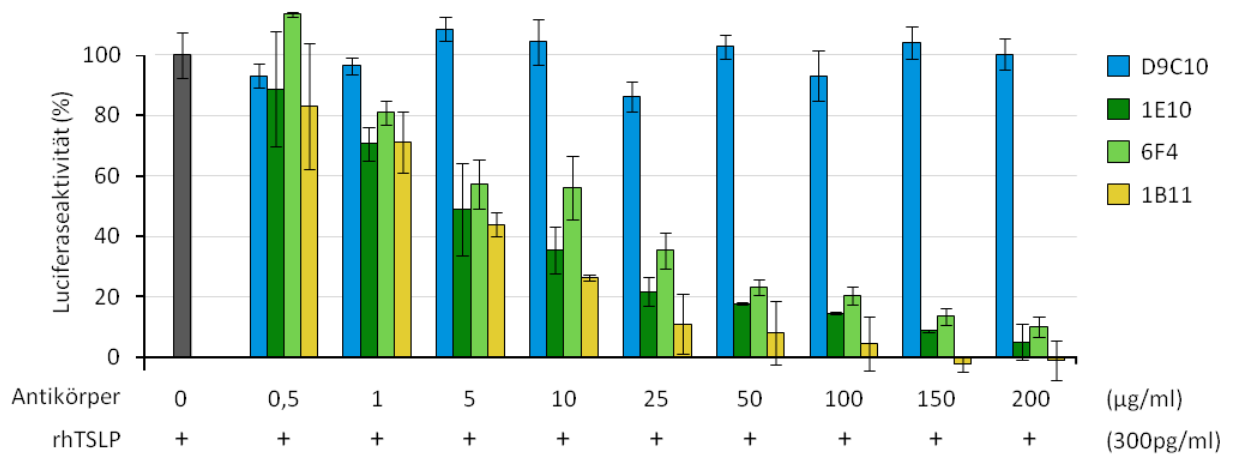
Abbildung 5.15: Detektion gereinigter anti-hTSLPR-Antikörper im Western-Blot

Pro Spur wurden jeweils 100 ng hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet (vgl. Abbildung 5.10(b)). Die Einzelmembranstreifen wurden mit den entsprechenden Antikörpern in einer Konzentration von 1 μ g/ml inkubiert. Dargestellt sind die Detektionssignale der gereinigten Antikörper VGG12 und D9C10 im Vergleich zu den Bindungssignalen des kommerziellen polyklonalen anti-hTSLPR-Antikörpers (R & D Systems). Als Positivkontrolle diente eine mit dem anti-P5D4-Antikörper, als Negativkontrolle eine nur mit sekundärem HRP-gekoppelten anti-mouse-Antikörper versetzte Membran.

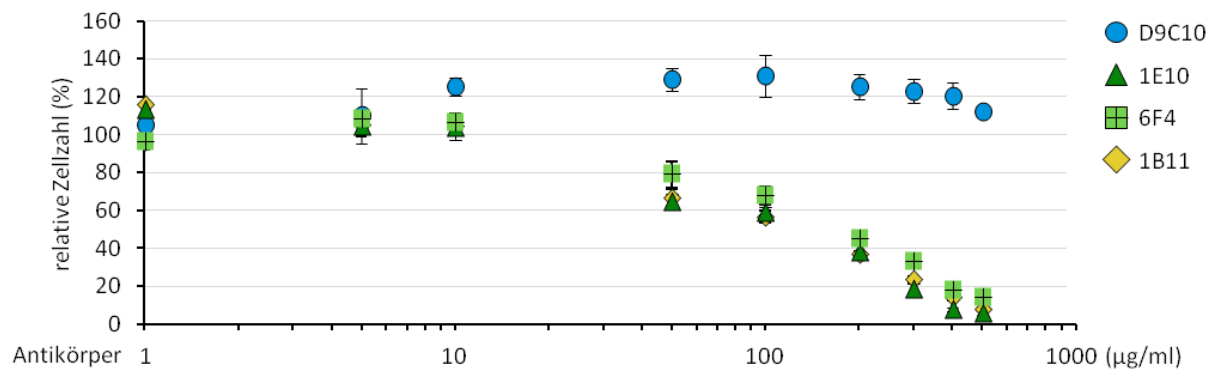
Von den monoklonalen Antikörpern wies VGG12 im Western-Blot das stärkste Bindungssignal auf, welches vergleichbar war mit der Positivkontrolle. D9C10 hingegen zeigte bei der gleichen eingesetzten Konzentration nur ein schwaches Signal, woraufhin dieser letztendlich als Western-Blot-geeigneter Antikörper ausgeschlossen wurde. Das Bindungssignal des kommerziellen polyklonalen anti-hTSLPR-Antikörpers war ebenfalls unerwartet schwächer als das von VGG12. Somit könnte VGG12 potentiell neben seiner Eignung als Oberflächenantikörper in der Durchflusszytometrie auch für Western-Blot-Detektionen einsetzbar sein. Eine Ermittlung der Detektionsgrenzen bezüglich des hTSLP-Rezeptorproteins wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

5.3.5 Charakterisierung inhibierender anti-hTSLPR-Antikörper

In Abschnitt 5.2.5 wurden die drei Antikörper 1E10, 6F4 und 1B11 identifiziert, welche bezüglich des humanen TSLP-Rezeptors inhibitorische Eigenschaften gezeigt hatten. Im Anschluss wurden in Form von Reporterassays, Proliferationstests und Western-Blot-Detektionen unter dem Einsatz vergleichbarer, abgestufter Antikörperkonzentrationen Dosis-Wirkungsbeziehungen an Ba/F3-hTSLPR-Zellen untersucht, um die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren und zu präzisieren. Für die Untersuchungen wurde stets der nicht-inhibitorische monoklonale anti-hTSLPR-Antikörper D9C10 als Kontrollantikörper verwendet. Für den Reporterassay wurden Ba/F3-hTSLPR-Zellen erneut mit dem STAT3-Reporterkonstrukt *pGL3-SOCS3* transfiziert (vgl. Abbildung 5.11) und mit aufsteigenden Konzentrationen der genannten Antikörper vorinkubiert. Anschließend er-



(a)



(b)

Abbildung 5.16: Charakterisierung inhibitorischer anti-hTSLPR-Antikörper

(a) **Reportergenassay:** Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden erneut mit dem Reportergenkonstrukt *pGL3-SOCS3* transfiziert und pro Ansatz etwa 5×10^4 Zellen für 1 h mit den angegebenen Konzentrationen der inhibitorischen Antikörper 1E10, 6F4, 1B11 und dem Kontrollantikörper D9C10 vorinkubiert. Die Stimulation mit 300 pg/ml rhTSLP erfolgte in einem Zeitraum von 16 h. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität luminometrisch bestimmt (vgl. Abbildungen 5.11 und 5.12). Die Werte in % beziehen sich auf transfizierte, stimulierte Zellen ohne Antikörper (100 %). Die Ergebnisse zeigen einen von drei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmung.

(b) **Proliferationsassay:** Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden für 6 h starviert, pro Ansatz 1×10^4 Zellen für 1 h mit den Antikörpern 1E10, 1B11, 6F4 und dem Kontrollantikörper D9C10 in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit 5 ng/ml rhTSLP stimuliert. Die Auswertung erfolgte nach 72 h mittels *CellTiter-Glo*[®] (Promega). Bei diesem Test wird der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen gemessen, welcher durch eine Luciferasereaktion luminometrisch erfasst wird (vgl. 4.2.8). Die relative Zellzahl in % bezieht sich auf stimulierte Zellen ohne Antikörper (100 %). Die Ergebnisse zeigen einen von drei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmung.

folgte die Stimulation mit rhTSLP und schließlich die Messung der Luciferaseaktivität, wie in Abbildung 5.16(a) gezeigt. Die Inhibitoren 1E10, 6F4 und 1B11 bewirkten in vergleichbarer Weise eine konzentrationsabhängige Abnahme der Luciferaseaktivität, was Ausdruck einer dosisabhängigen Blockierung des hTSLP-Rezeptors und der nachfolgenden Signalwege war. Eine halbmaximale Hemmung wurde bei Antikörperkonzentrationen zwischen 5 – 10 µg/ml erreicht. Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit die inhibitorischen Antikörper das Proliferationsvermögen der hTSLP-abhängigen Ba/F3-hTSLPR-Linie beeinflussen konnten. Dazu wurden die Zellen starviert, mit den entsprechenden Antikörperkonzentrationen vorinkubiert und im Anschluss mit hTSLP stimuliert. Der Grad der Proliferation wurde luminometrisch bestimmt, wie in Abbildung 5.16(b) gezeigt. Die drei Antikörper vermochten konzentrationsabhängig in ähnlicher Weise die hTSLP-induzierte Proliferation von Ba/F3-hTSLPR-Zellen zu hemmen, wobei die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 1E10 etwa bei 0,6 µM lag. Da die hemmende Wirkung der drei gereinigten Antikörper in allen Messungen nahezu vergleichbar war, ist anzunehmen, dass im Rahmen der Subklonierung der polyklonalen Hybridoma-Mischung *RB10* (vgl. 5.2.2) drei identische Einzelklone gewonnen worden waren und es sich demzufolge bei 1E10, 6F4 und 1B11 um Abkömmlinge desselben Klon handelt. Die Antikörper wurden in folgenden Untersuchungen je nach Verfügbarkeit äquivalent eingesetzt. Im Anschluss musste überprüft werden, ob der beobachtete inhibitorische Effekt allein auf die Funktionalität und nicht auf eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung der Antikörper auf Ba/F3-hTSLPR-Zellen zurückzuführen war. Anhand der Quantifizierung der Aktivität des Enzyms *Laktat-Dehydrogenase* (LDH), welches im Plasma jeder Zelle lokalisiert ist und bei Schädigung der Zellmembran nach außen ins Medium freigesetzt wird, wurde die dosisabhängige Wirkung der inhibitorischen Antikörper auf Ba/F3-hTSLPR-Zellen untersucht. Dabei konnte ein unspezifischer zytotoxischer Effekt von 1E10, 6F4 und 1B11 ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt, (Borowski 2012)). Im Anschluss wurde die Tyrosinphosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT5 in Ba/F3-hTSLPR-Zellen nach Anwendung der hTSLPR-Antagonisten in einer Western-Blot-Detektion untersucht (siehe Abbildung 5.17). Die Zellen wurden starviert und mit aufsteigenden Konzentrationen der Inhibitoren 1E10, 6F4 und dem Kontrollantikörper D9C10 versetzt. Nach der Stimulation mit hTSLP wurden sie lysiert, die so freigesetzten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen anti-STAT-Antikörpern im Western-Blot detektiert. Aufgrund der Tatsache, dass bei einer Inkubationszeit von 1 h mit der höchsten Antikörperkonzentration von 200 µg/ml noch keine Hemmung der Phosphorylierung beider Transkriptionsfaktoren erzielt werden konnte, wurde die Inkubationszeit auf 12 h verlängert und die maximale Antikörperkonzentration auf 500 µg/ml erhöht. Auf

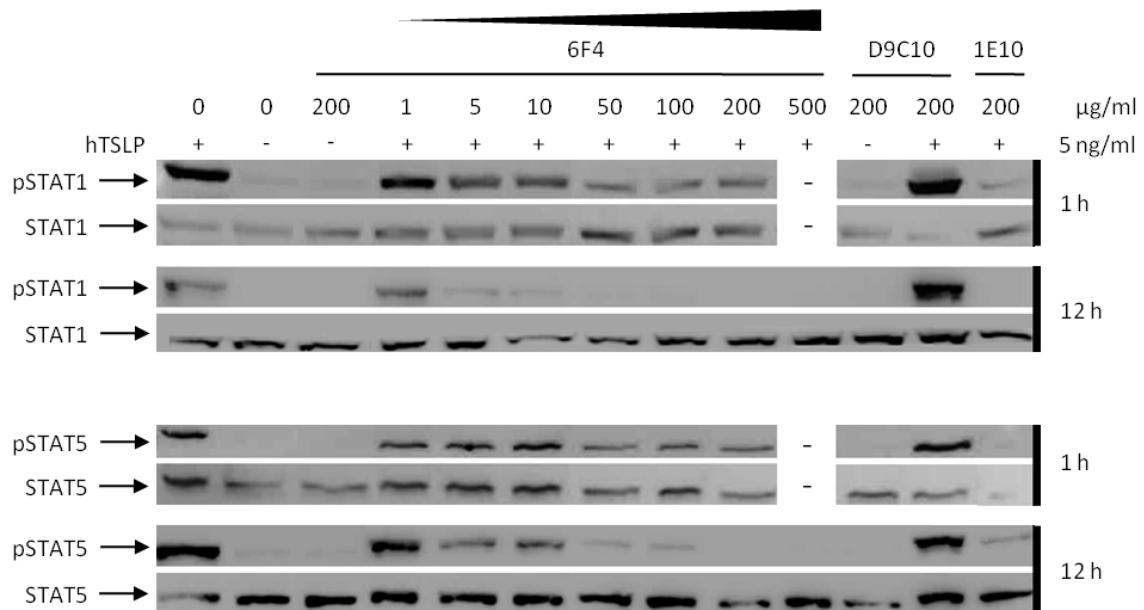


Abbildung 5.17: Untersuchung der hTSLP-induzierten Tyrosinphosphorylierung von STAT1 und STAT5 nach Anwendung spezifischer hTSLPR-Antagonisten an Ba/F3-hTSLPR-Zellen

Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden starviert und jeweils 1×10^6 Zellen für 1 h bzw. 12 h mit den angegebenen Konzentrationen der inhibitorischen Antikörper 6F4 und 1E10 sowie dem Kontrollantikörper D9C10 vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 10 ng/ml rhTSLP stimuliert und danach lysiert. In einem 8,5 %igen SDS-Gel wurden jeweils 80 µg Protein aus Zelllysaten elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mittels pSTAT1- und pSTAT5-spezifischer und nach dem Strippen der Membranen mittels STAT1-, STAT5-spezifischer Antikörper (vgl. 4.4). Die Ergebnisse repräsentieren zwei von vier unabhängigen Versuchen.

diese Weise konnte eine konzentrationsabhängige Blockierung der zytokinvermittelten Tyrosinphosphorylierung von STAT1 und STAT5 erreicht werden, welche bei einer Antikörperkonzentration zwischen 200 µg/ml und 500 µg/ml vollständig ausgeprägt war. Der nicht-inhibitorische Kontrollantikörper D9C10 wies dabei keinerlei hemmenden Effekt auf.

Anhand dieser Ergebnisse konnte die Funktionalität der hTSLPR-Antagonisten 1E10, 6F4 und 1B11 bestätigt werden und ihr inhibitorischer Einfluss auf die Signalübertragung in Ba/F3-hTSLPR-Zellen verifiziert werden.

5.4 Anwendung funktioneller anti-hTSLPR-Antikörper zur Analyse humaner Blutzellen

5.4.1 Untersuchung humaner Monozyten und B-Lymphozyten auf eine hTSLPR-Expression

Nachdem VGG12 zytometrisch als signalstärkster anti-hTSLPR-Oberflächenantikörper bestimmt und auf seine Spezifität überprüft worden war (vgl. 5.3), wurde seine Eignung zur Erkennung des natürlich exprimierten hTSLP-Rezeptors auf humanen Zellen untersucht. Hinsichtlich der Annahme, dass Monozyten und B-Lymphozyten möglicherweise den hTSLP-Rezeptor exprimieren (Park et al. 2000, Zhang et al. 2001) und aufgrund ihrer einfachen Verfügbarkeit, wurden diese Zellen für die Erprobung des gewonnenen Antikörpers VGG12 im humanen System gewählt. Aus humanen Vollblutkonserven gesunder Spender wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) aus dem sogenannten *Buffy Coat* isoliert. Dies ist eine Schicht bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, welche mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wird. Die Identifizierung der Monozyten und B-Lymphozyten innerhalb der PBMC-Gesamtpopulation erfolgte über die Detektion populationspezifischer CD-Oberflächenmoleküle (*Clusters of differentiation*) mittels spezifischer, Fluorophor-gekoppelter anti-CD-Antikörper. Für Monozyten wurden anti-CD14-, für B-Zellen anti-CD19-Antikörper eingesetzt. Die Zellen wurden mit den genannten Anti-

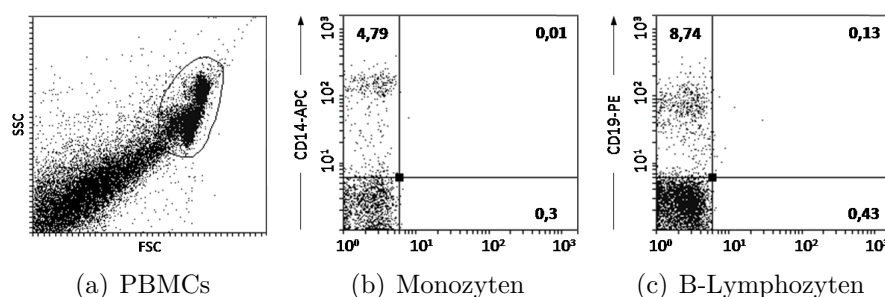


Abbildung 5.18: Zytometrische Identifizierung von Leukozyten-Teilpopulationen peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs)

Mittels Dichtezentrifugation wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) aus humanen Vollblutkonserven isoliert (vgl. 4.2.7). Durch die Anwendung spezifischer, *Allophycocyanin* (APC)-gekoppelter anti-CD14- bzw. PE-gekoppelter anti-CD19-Antikörper erfolgte die zytometrische Identifizierung von Monozyten (b) bzw. B-Lymphozyten (c) innerhalb der PBMC-Population (a). Die prozentualen Anteile der Teilpopulationen wurden mit dem Programm *Cytflogic* berechnet und beziehen sich auf die Zielpopulation *PBMCs* im *FSC-SSC*-Diagramm (*Gate* in (a)).

körpern inkubiert und zytometrisch analysiert. Bezogen auf die durch ein *Gate* definierte Zielpopulation (*PBMCs*) im *FSC-SSC*-Diagramm wurden die Teilpopulationen (*Monozyten* bzw. *B-Lymphozyten*) prozentual analysiert. In Abbildung 5.18 werden beispielhaft die Ergebnisse der Analyse gezeigt. Die prozentualen Anteile der Populationen in Bezug auf die *PBMC*-Gesamtpopulation schwankten interindividuell. Spenderabhängig ($n = 5$) wies die Monozyten-Population einen Anteil von 4,6 – 11 %, die der B-Lymphozyten von 6 – 10 % auf. Um sicherzustellen, dass eventuell detektierte Bindungssignale nicht von unspezifischen Bindungen an *PBMCs* herrührten, wurden Kontrollen mit dem Isotypen-Antikörper IgG1 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Danach erfolgte versuchsweise die Koinkubation der *PBMCs* mit den genannten anti-CD-Antikörpern und dem anti-hTSLPR-Antikörper VGG12. Angesichts der Tatsache, dass VGG12 selbst nicht Fluorophor-gekoppelt war, bestand die Notwendigkeit des Einsatzes eines sekundären anti-mouse-Antikörpers. Dieser Umstand stellte jedoch ein Hindernis der Untersuchungen dar, da die Negativkontrolle, nämlich ausschließlich mit sekundärem Antikörper inkubierte *PBMCs*, bezogen auf die Zielpopulation stets ein erhebliches unspezifisches Hintergrundsignal von 30 – 40 % aufwies (Daten nicht gezeigt). Um die Notwendigkeit eines sekundären Antikörpers zu umgehen und größtmögliche Spezifität des anti-hTSLPR-Antikörpers VGG12 gegenüber *PBMCs* zu erreichen, wurde dieser mit dem Fluorophor *Fluoresceinisoithiocyanate* (FITC) konjugiert. Dazu wurde eine ausreichend konzentrierte Antikörperlösung des gereinigten VGG12 mittels Zentrifugation durch Ultrafiltrationsröhrchen in Natriumcarbonatpuffer umgepuffert und anschließend mit einer Fluorophorlösung inkubiert, welche reines FITC und Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt. Dabei wurde die FITC-Menge abhängig von der Antikörperkonzentration variiert (vgl. 4.4.10). Bei einer Konzentration von etwa 150 µg FITC/ mg Antikörper war die Konjugation erfolgreich. Da laut Herstellerangaben ungebundene FITC-Moleküle aufgrund ihres geringen Molekulargewichts bei der Zentrifugation durch Ultrafiltrationsröhrchen nahezu vollständig entfernt werden, wurde auf eine anschließende Reinigung der Antikörperlösung verzichtet. Der gewonnene fluoreszenzmarkierte Antikörper, welcher im Folgenden als VGG12-FITC bezeichnet wird, wurde im Anschluss im Vergleich zum unkonjugierten VGG12-Antikörper auf seine Bindungseigenschaften an Ba/F3-hTSLPR-Zellen zytometrisch überprüft, wie in Abbildung 5.19(a) gezeigt. Diese waren gegenüber denen des unkonjugierten Antikörpers zwar geringfügig reduziert, aber durchaus ausreichend für den Nachweis des hTSLP-Rezeptors im Durchflusszytometer. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des Fluorophors FITC an Zelloberflächenproteinen wurde der konjugierte Antikörper zusätzlich an transient transfizierten Ba/F3-hIL-7R α -Zellen getestet, wie in Abbildung 5.19(b–d) gezeigt. In dem Test wies VGG12-FITC lediglich eine schwache unspezifische Bindung auf, welche möglicherweise auf einen geringen Anteil

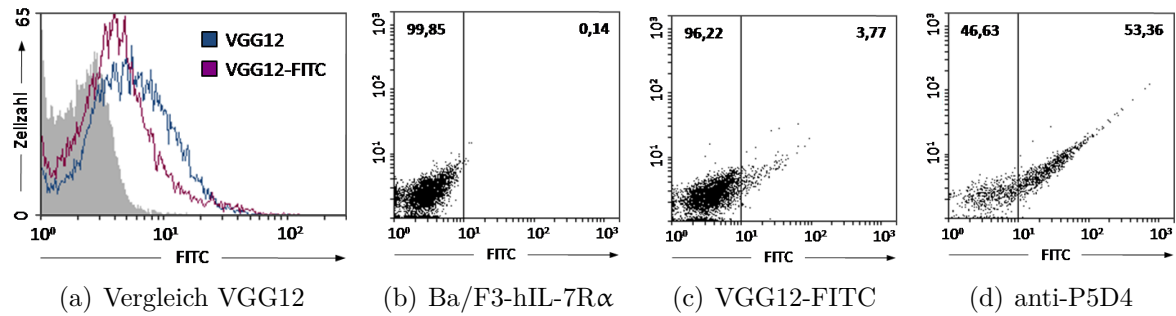


Abbildung 5.19: Bindungs- und Spezifitätskontrolle des VGG12-FITC

(a) Ba/F3-hTSLPR-Zellen wurden mit jeweils 1 $\mu\text{g/ml}$ des konjugierten VGG12-FITC bzw. des unkonjugierten VGG12 inkubiert, wobei letzterer mit einem sekundären, FITC-gekoppelten anti-mouse-Antikörper versetzt wurde. Anschließend erfolgte die zytometrische Analyse. (b–d) Zur Spezifitätskontrolle wurden transient transfizierte Ba/F3-hIL-7R α -Zellen ohne hTSLPR α -Kette (vgl. Abbildung 5.8) mit 1 $\mu\text{g/ml}$ VGG12-FITC inkubiert und zytometrisch analysiert. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten Ba/F3-hIL-7R α -Zellen. Als Positivkontrolle wurde der anti-P5D4-Antikörper eingesetzt.

ungebundener FITC-Moleküle zurückzuführen war. Schließlich wurde der konjugierte VGG12-FITC zur Untersuchung von Monozyten und B-Lymphozyten hinsichtlich einer Oberflächenexpression des hTSLP-Rezeptors verwendet. Sowohl frisch isolierte als auch für 12 – 24 h in RFG-Medium kultivierte PBMCs wurden mit den genannten anti-CD-Antikörpern und VGG12-FITC koinkubiert und zytometrisch analysiert. Bei frisch isolierten PBMCs konnte jedoch keine hTSLP-Rezeptorexpression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei zuvor kultivierten PBMCs allerdings wurde in unabhängigen Versuchen ($n = 3$) eine CD14 $^{+}$ -Monozytenpopulation mit einer hTSLP-Rezeptorexpression identifiziert, welche etwa 3 – 4 % der PBMC-Gesamtpopulation ausmachte. Bei der Untersuchung der B-Lymphozyten konnte eine Population von jeweils etwa 3 % abgegrenzt werden, welche gleichzeitig den hTSLP-Rezeptor und eine schwache CD19 $^{+}$ -Oberflächenexpression aufwies. Die Abbildung 5.20 präsentiert beispielhaft die Ergebnisse einer Analyse.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sich der Oberflächenantikörper VGG12 für die Identifizierung des natürlich exprimierten hTSLP-Rezeptors auf primären humanen Zellen eignet.

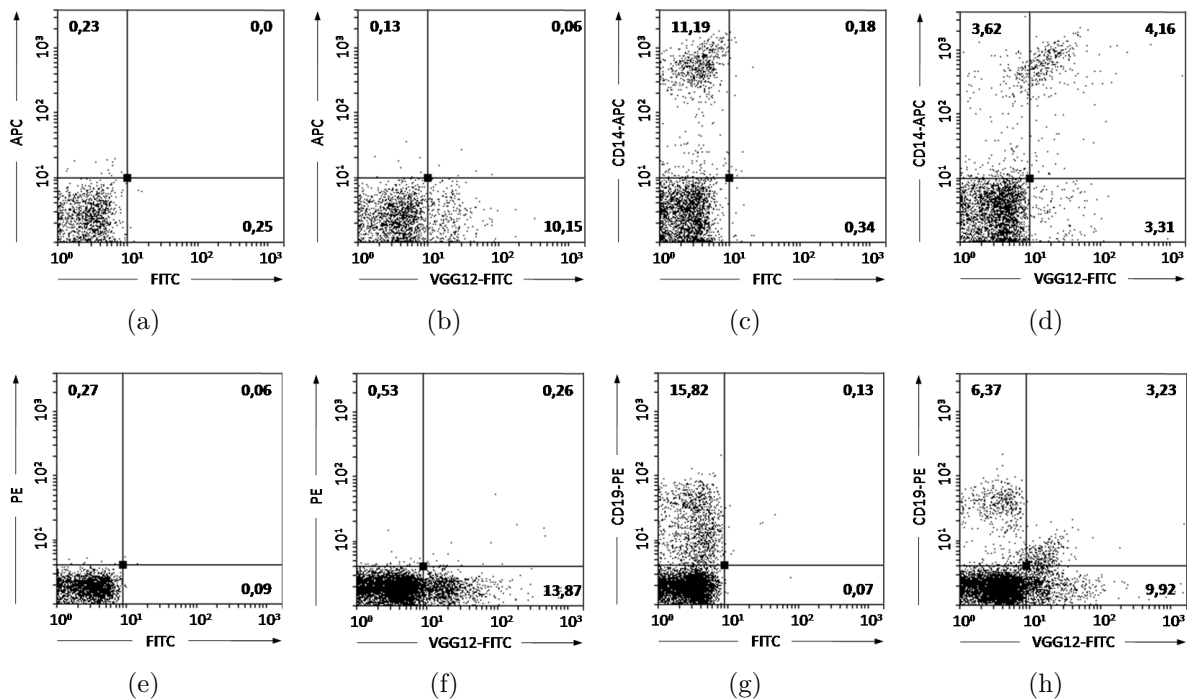


Abbildung 5.20: Untersuchung von Monozyten und B-Lymphozyten bezüglich einer hTSLPR-Expression mittels VGG12-FITC

PBMCs wurden zunächst für 12 – 24 h in RFG-Medium kultiviert und anschließend mit den Antikörpern anti-CD14-APC für die Identifizierung von Monozyten (c–d), anti-CD19-PE für die Identifizierung von B-Lymphozyten (g–h) und dem anti-hTSLPR VGG12-FITC koinkubiert und zytometrisch analysiert. (a) und (e) sind Negativkontrollen aus unbehandelten PBMCs, (b) und (f) zeigen ausschließlich mit VGG12-FITC inkubierte PBMCs. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die PBMC-Gesamtpopulation (vgl. Abbildung 5.18). Gezeigt ist einer von drei unabhängigen Versuchen.

5.4.2 Untersuchung von humanen B-ALL-Zelllinien auf eine hTSLPR-Expression

Wie Yoda et al. (2010) und andere berichten, liegt der hTSLP-Rezeptor bei der akuten lymphatischen Leukämie der B-Zellen (B-ALL) bei etwa 15 % der Patienten ohne B-ALL-typische Genveränderungen in überexprimierter Form vor und spielt vermutlich eine Rolle bei der Signaltransduktion der entarteten Zellen (siehe Einleitung). Angesichts der Tatsache, dass der Antikörper VGG12 erfolgreich zur Detektion des präsentierten hTSLP-Rezeptorproteins an primären Blutzellen angewendet werden konnte, eröffneten die gewonnenen Erkenntnisse die Möglichkeit, VGG12 als spezifischen und sensitiven Antikörper zur Identifizierung des hTSLP-Rezeptors auf der Zelloberfläche humaner B-ALL-Zellen einzusetzen. Da für diese Arbeit keine primären Zellen von Patienten mit

einer B-ALL zugänglich waren, wurden kultivierbare humane B-ALL-Zelllinien bezüglich einer Oberflächenexpression des hTSLP-Rezeptors durchgemustert. Die Möglichkeit der Langzeitkultivierung primärer humaner lymphoblastischer Leukämiezellen wurde erst kürzlich durch die Verwendung serum- und wachstumsfaktorfreien Mediums etabliert (Nijmeijer et al. 2009). In diesem Projekt wurden 10 der 12 von Nijmeijer et al. (2009) beschriebenen kultivierbaren Linien untersucht. Diese wurden von PD Dr. O. G. Ottmann und Susanne Badura, Institut für Hämatologie und Onkologie des Klinikums der J. W. Goethe-Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Bei den Zelllinien handelte es sich um BV, CR, HP, KW, PH, RL, SK, VB, VG und WD, welche B-ALL-Subtypen wie pro-B-, common-B-, pre-B-ALL und CML-LBP (*chronic myeloid leukemia in lymphatic blastic phase*) enthielten und ursprünglich von Patienten im Alter von 19 – 62 Jahren (Median 37 Jahre) stammten. Die Zellen wiesen einerseits typische zytogenetische Translokationen, wie *bcr-abl*, *etv6-abl*, t(1;19), t(4;11), t(11;19), andererseits neue Aberrationen auf (Nijmeijer et al. 2009). Die Zellen der genannten Linien wurden jeweils mit dem anti-hTSLPR-Antikörper VGG12 und einem sekundären Antikörper inkubiert und zytometrisch analysiert, wie in Abbildung 5.21(a–d) auszugsweise gezeigt wird. Zusätzlich wurden Kontrollen mit dem Isotypenantikörper IgG1 durchgeführt, bei welchem keine unspezifischen Bindungen nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt). Bei der zytometrischen Untersuchung konnten zwei Zelllinien identifiziert werden, die den hTSLP-Rezeptor exprimierten, wobei die Zellen der Linie HP ein starkes, die der Linie CR ein schwächeres Expressionssignal ausprägten. Die Rezeptorexpression wurde zusätzlich durch eine Western-Blot-Detektion mithilfe des kommerziellen polyklonalen anti-hTSLPR-Antikörpers bestätigt, wie in Abbildung 5.21(e) gezeigt wird. Dazu wurden aus den Zellen der Linien HP, CR und zu Kontrollzwecken der Linie Ba/F3-hTSLPR Lysate hergestellt, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Mithilfe des polyklonalen anti-hTSLPR-Antikörpers konnte bei der Zelllinie HP ein eindeutiges Signal detektiert werden, welches für eine Expression des hTSLP-Rezeptors sprach. Die Banden zeichneten sich durch ein charakteristisch unscharfes Erscheinungsbild im Bereich von 55 – 100 kDa ab, was vermutlich auf Protein-Glykosylierungen zurückzuführen ist. Bei der Linie CR konnte nur ein schwaches Signal detektiert werden, was mit den Beobachtungen der zytometrischen Analyse korrespondiert, bei welcher ebenfalls nur eine schwache hTSLPR-Expression nachgewiesen wurde.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sich der gewonnene Antikörper VGG12 für das zytometrische Screening humaner B-ALL-Zellen bezüglich der Expression des hTSLP-Rezeptors eignet. Des Weiteren konnte unter den zehn untersuchten B-ALL-Linien tatsächlich eine identifiziert werden, die den hTSLP-Rezeptor überexprimierte.

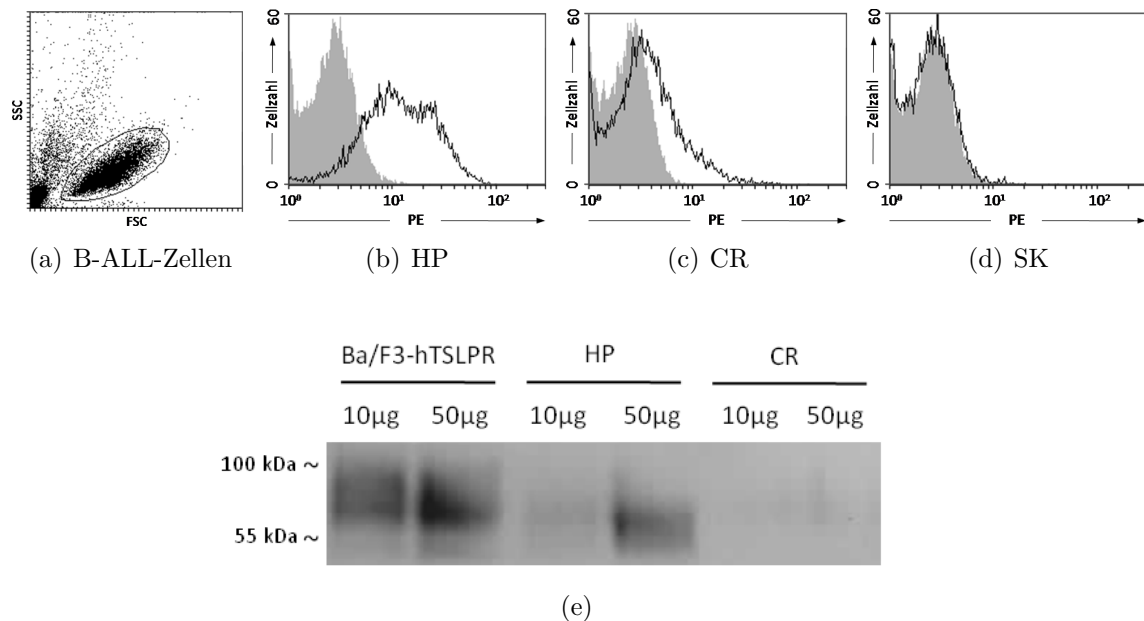


Abbildung 5.21: Untersuchung humaner B-ALL-Zelllinien bezüglich einer hTSLPR-Expression mittels anti-hTSLPR-Antikörper

(a–d) **Zytometrische Analyse:** Die B-ALL-Zelllinien HP, CR und SK wurden mit dem anti-hTSLPR-Antikörper VGG12 und einem sekundären, PE-gekoppelten anti-mouse-Antikörper inkubiert und zytometrisch analysiert. In (a) ist beispielhaft die Zielpopulation der Linie HP im *FSC-SSC*-Diagramm in linearer Skaleneinteilung abgebildet. Gezeigt ist einer von zwei unabhängigen Versuchen.

(e) **Western-Blot:** Jeweils 10 µg und 50 µg Protein aus Zelllysaten der B-ALL-Zelllinien HP und CR sowie der Kontrollzelllinie Ba/F3-hTSLPR wurden in einem 12,5 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem polyklonalen anti-hTSLPR-Antikörper (R & D Systems) in einer Konzentration von 1 µg/ml. Als sekundärer Antikörper wurde ein HRP-gekoppelter anti-goat-Antikörper eingesetzt. Gezeigt ist einer von drei unabhängigen Versuchen.

5.4.3 Vorversuche zum Einsatz von hTSLPR-Antagonisten an humanen B-ALL-Zelllinien

Aufgrund ihrer ausgeprägten hTSLP-Rezeptorexpression wurde die B-ALL-Zelllinie HP für die Untersuchung der Funktionalität inhibitorischer anti-hTSLPR-Antikörper und deren Auswirkung auf zellphysiologische Parameter in humanen Zellen verwendet. Zunächst wurde das Proliferationsverhalten der Zellen der Linie HP im Vergleich zur Linie CR mit schwacher und zur Linie SK ohne hTSLP-Rezeptorexpression in Reaktion auf eine Stimulation mit hTSLP untersucht. Die Zellen wurden in faktorfreiem Medium starviert und mit aufsteigenden Konzentrationen des Zytokins versetzt. Die Proliferation wurde nach 96 h gemessen, da sich die Zellzahl der Linien jeweils erst nach etwa drei Tagen ver-

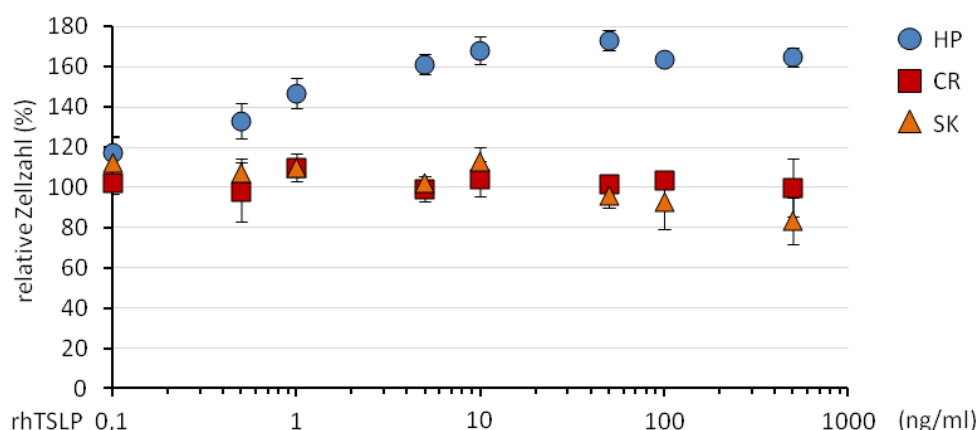


Abbildung 5.22: Proliferationsassay humaner B-ALL-Zellen in Reaktion auf hTSLP

(a) Die Zellen der B-ALL-Zelllinien HP, CR und SK wurden in faktorfreiem IMDM-Medium starviert und anschließend jeweils 1×10^4 Zellen mit rhTSLP in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Auswertung erfolgte luminometrisch nach 96 h mittels *CellTiter-Glo*[®] (vgl. 4.2.8). Die Proliferationszunahme wird in Bezug auf die Basisproliferation der unstimulierten Probe (100 %) angegeben. Gezeigt ist einer von zwei unabhängigen Versuchen als Doppelbestimmung.

doppelte. Die Abbildung 5.22 zeigt das Ergebnis der Proliferationsassays der drei Linien im Vergleich. Im Gegensatz zu den beiden anderen B-ALL-Zelllinien wies die Linie HP in Reaktion auf hTSLP eine dosisabhängige Wachstumszunahme um maximal 60 – 70 % auf. Ab einer hTSLP-Konzentration von etwa 5 ng/ml ging die Proliferation in eine Sättigung über. Daraufhin wurde untersucht, ob durch die Anwendung eines inhibitorischen anti-hTSLPR-Antikörpers eine Proliferationshemmung erzielt werden konnte. Dazu wurden die Zellen der Linie HP starviert, mit aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors 1E10 und dem nicht-inhibitorischen Kontrollantikörper D9C10 vorinkubiert und danach mit hTSLP stimuliert. Das Ergebnis wird in Abbildung 5.23(a) gezeigt. Der Einsatz von 1E10 führte zu einer dosisabhängigen Wachstumshemmung der behandelten Zellen. Der Kontrollantikörper D9C10 zeigte überraschenderweise ebenfalls einen geringfügigen proliferationshemmenden Effekt, welcher im Vergleich zu 1E10 jedoch nur schwach ausgeprägt war. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 1E10 lag etwa zwischen 50 – 75 $\mu\text{g/ml}$. Da die Proliferations- und Inhibitionsassays allerdings jeweils nur auf Dreifachbestimmungen beruhen, konnte aufgrund der zu geringen Probenzahl in keinem der durchgeführten Assays eine Signifikanz nachgewiesen werden (siehe Diskussion). Um eine unspezifische, zytotoxische Wirkung der Antikörper auf die Leukämiezellen auszuschließen, wurde anhand der Quantifizierung der Aktivität des Enzyms LDH die dosisabhängige Wirkung der verwendeten Antikörper auf die Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen der Linie HP in aufsteigenden Konzentrationen mit dem inhibierenden Antikörper 1E10 und dem Kontroll-

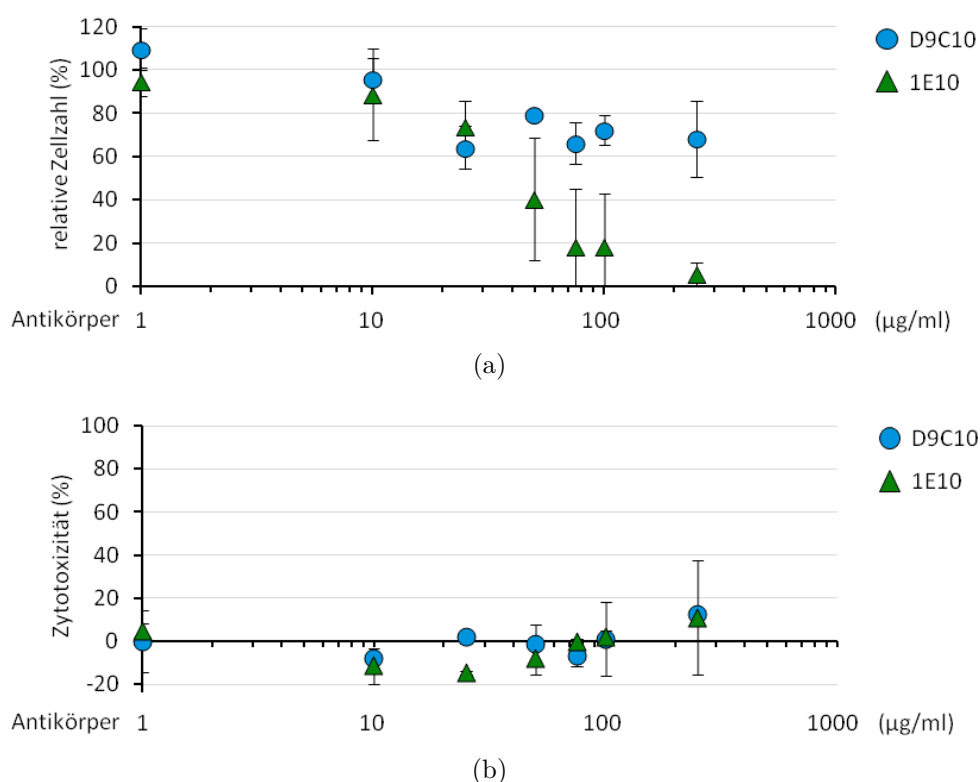


Abbildung 5.23: Wirkung inhibierender anti-hTSLPR-Antikörper auf die Linie HP
 (a) **Proliferationsassay:** Die Zellen wurden in IMDM-Medium starviert und jeweils 1×10^4 Zellen für 6 h mit dem inhibitorischen anti-hTSLPR-Antikörper 1E10 bzw. dem Kontrollantikörper D9C10 in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert. Danach folgte die Stimulation mit 10 ng/ml rhTSLP. Nach 96 h wurde die Proliferation luminometrisch erfasst (vgl. Abbildung 5.22). Gezeigt ist einer von drei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmung.
 (b) **Zytotoxizitätstest:** Jeweils 1×10^4 Zellen wurden für 96 h mit den Antikörpern 1E10 und D9C10 in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Für den Test wurde das *Cytotoxicity Detection Kit^{Plus}* gemäß den Herstellerangaben verwendet und die LDH-Konzentration im Medienüberstand durch eine Absorbanzmessung bei 495 nm bestimmt (vgl. 4.2.9). Die Werte in % beziehen sich auf die LDH-Menge aus Zelllysaten (100 %) und auf die LDH-Menge von Medienüberständen unbehandelter Zellen (0 %).

antikörper D9C10 inkubiert und anschließend die LDH-Konzentration im Medienüberstand bestimmt, wie in Abbildung 5.23(b) gezeigt wird. Beide Antikörper wiesen lediglich bei der höchst eingesetzten Konzentration von 250 µg/ml einen minimalen zytotoxischen Effekt auf. Wie Brown et al. (2007) und andere berichten scheinen phosphorylierte Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie an der Signaltransduktion von B-ALL-Zellen mit ausgeprägter hTSLP-Rezeptorexpression beteiligt zu sein. Aus diesem Grund wurden Vorversuche zur Induktion und Hemmung der Tyrosinphosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5 durchgeführt. Dazu wurden die Zellen der Linie HP und der Kontrollzelllinie Ba/F3-hTSLPR starviert und jeweils mit dem inhibitorischen Antikörper 1E10 in einer

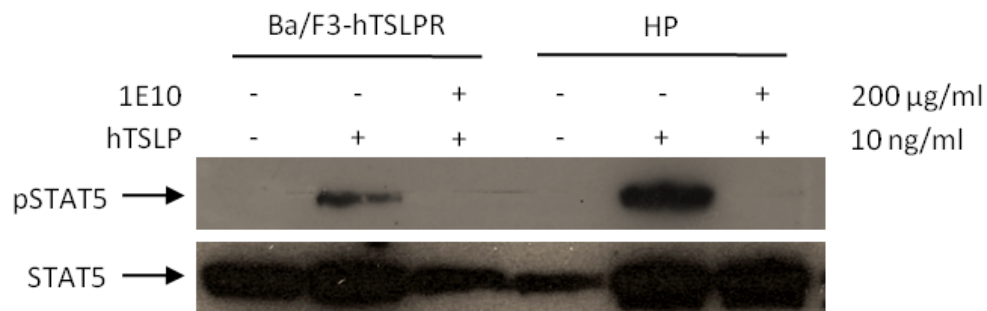


Abbildung 5.24: Untersuchung der hTSLP-induzierten Tyrosinphosphorylierung von STAT5 und ihrer Inhibition durch antagonistische anti-hTSLPR-Antikörper anhand der B-ALL-Zelllinie HP

Die Zellen der Linie HP und der Kontrollzelllinie Ba/F3-hTSLPR wurden in faktorfreiem IMDM-Medium bzw. RFG-Medium starviert und jeweils 1×10^6 Zellen für 6 h mit 200 µg/ml des inhibitorischen Antikörpers 1E10 vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 10 ng/ml rhTSLP stimuliert und danach lysiert. In einem 8,4 %igen SDS-Gel wurden jeweils 80 µg Protein der Lysate elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mittels pSTAT5- und nach dem Strippen der Membranen mittels STAT5-spezifischer Antikörper (vgl. 4.4, vgl. Abbildung 5.17).

Konzentration von 200 µg/ml vorinkubiert, da bei dieser Antikörperkonzentration die Phosphorylierung von STAT5 bei Ba/F3-hTSLPR-Zellen nahezu vollständig gehemmt werden konnte (vgl. Abbildung 5.17). Anschließend wurden die Zellen mit 10 ng/ml hTSLP stimuliert, da die hTSLP-abhängige Proliferation der Linie HP bei dieser Konzentration scheinbar in der Sättigung war. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mittels pSTAT5- und STAT5-spezifischer Antikörper. In Abbildung 5.24 wird das Ergebnis der Western-Blot-Detektion gezeigt. Die Stimulation mit hTSLP führte bei der Zelllinie HP zu einer ausgeprägten STAT5-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu war die STAT5-Phosphorylierung bei den mit 1E10 inkubierten Zellen vollständig aufgehoben.

Wie die Ergebnisse der Vorversuche zeigen, scheint die hTSLPR⁺ B-ALL-Zelllinie HP auf eine Stimulation mit hTSLP sowohl mit einer Proliferationssteigerung als auch mit einer Tyrosinphosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5 zu reagieren, welche durch den Einsatz inhibitorischer anti-hTSLPR-Antikörper offenbar antagonisiert werden können.

6 Diskussion

Dem Zytokin *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) und seinem Rezeptor, welcher sich aus der TSLPR α - und der IL-7R α -Untereinheit zusammensetzt, wurden in den letzten Jahren sowohl bei der Entwicklung atopischer Erkrankungen als auch bei der Entstehung maligner Tumorerkrankungen wichtige Funktionen zugeschrieben (Ziegler 2010, De Monte et al. 2011, Olkhanud et al. 2011). Die Wirkung von TSLP auf das Immunsystem, besonders im Rahmen allergischer Erkrankungen wie beim Asthma bronchiale und der atopischen Dermatitis, ist bereits in mehreren Publikationen und auch innerhalb der Arbeitsgruppe thematisiert worden (Sebastian et al. 2008, Borowski 2012). Die Rolle von TSLP bei der Genese von Tumorerkrankungen, wie Brustkrebs und Pankreaskrebs, ist Gegenstand der derzeitigen Forschung (De Monte et al. 2011, Olkhanud et al. 2011). Erst seit kurzem wird dem hTSLP-Rezeptor eine malignitätsrelevante Bedeutung bei der B-ALL beigemessen. Dabei scheint eine hTSLPR-Überexpression mit einem ungünstigen Verlauf der B-ALL assoziiert zu sein (Yoda et al. 2010).

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung funktioneller monoklonaler Antikörper gegen den humanen TSLP-Rezeptor, speziell gegen die humane hTSLPR α -Untereinheit, mithilfe der von C. Milstein, G. Köhler und N. Jerne etablierten Hybridomatechnik (Köhler und Milstein 1975). Aus drei verschiedenen Fusionen wurde eine Vielzahl polykloner Hybridomamischungen gewonnen. Nur drei produzierten Antikörper mit zytometrisch detektierbaren Bindungssignalen an der Ba/F3-hTSLPR-Zelllinie. Durch anschließend durchgeführte Subklonierungen wurden etwa 100 Hybridoma-Einzelklone isoliert, welche monoklonale Antikörper mit Bindung an den rekombinanten humanen TSLP-Rezeptor bildeten. Es ist wahrscheinlich, dass einige Klone bei dem Prozess der Subklonierung mittels der *limiting dilution*-Methode (Luttmann et al. 2009) mehrmals selektioniert worden waren. Somit ist davon auszugehen, dass alle isolierten Einzelklone von einer nur geringen Anzahl verschiedener, anti-hTSLPR-Antikörper-sezernierender Hybridomaklone stammen, welche sich ursprünglich in den drei selektierten polyklonen Hybridomamischungen befanden. Aufgrund der Tatsache, dass das für die Immunisierung der *BALB/c*-Mäuse eingesetzte hTSLPR α_{ex} -Rezeptorprotein nur in etwa 85 %iger Reinheit vorlag, wurden im Rahmen der murinen Immunreaktion neben anti-hTSLPR-Antikörpern offenbar auch solche gegen die Proteinverunreinigungen gebildet. In ELISA-Spezifitätstests wurden somit beispielsweise auch Antikörper identifiziert, welche gegen fetales Kälberserum (FCS) gerichtet waren (Daten nicht gezeigt und (Borowski 2012)). Gleichzeitig stellte das P5D4-Epitop als Bestandteil des für die Immunisierung verwendeten Zielproteins ein potentes Antigen dar. Das synthetische P5D4-Peptid besteht aus 15 Aminosäuren

und stammt ursprünglich aus der zytoplasmatischen Domäne des transmembranösen *Vesicular stomatitis virus*-Glykoproteins (VSV-G) (Kreis 1986). In dieser Arbeit diente der P5D4-Tag häufig als Erkennungssequenz. Unter den monoklonalen Antikörpern, die mithilfe der hTSLP-Rezeptor- und P5D4-exprimierenden murinen Ba/F3-hTSLPR-Zelllinie selektioniert worden waren, befanden sich etwa 10 – 20 % P5D4-bindende Antikörper (Daten nicht gezeigt). Der His-Tag war ebenfalls ein Bestandteil des Zielproteins. Hinsichtlich des Anteils von anti-His-Antikörpern kann jedoch keine Aussage getroffen werden, da die Ba/F3-hTSLPR-Zellen ihrerseits keinen His-Tag exprimierten und alle Antikörper, welche nicht an diese Zelllinie banden, verworfen wurden. Alle potentiellen anti-hTSLPR-Antikörper wurden mehrmals zytometrisch und im ELISA auf ihre Spezifität überprüft, nicht-spezifische Antikörper wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Die Identifizierung von anti-hTSLPR-Antikörpern, welche für die Erkennung denaturierten hTSLP-Rezeptorproteins im Western-Blot geeignet waren, erfolgte im Vorfeld mittels einer Detektion im Dot-Blot, einer abgewandelten, vereinfachten Variante des Western-Blots. Von den 27 getesteten Antikörpern aus Hybridoma-Überständen zeigten im Dot-Blot 15 Antikörper Bindungssignale, die restlichen wurden verworfen. Rückblickend erwies sich diese Methode jedoch als nicht verlässlich, da die detektierten Signale zum einen nicht immer reproduzierbar, zum anderen nicht zwangsläufig spezifisch waren. So fielen die Bindungssignale einiger Antikörper, wie zum Beispiel von D9C11 oder D9G8, welche im Dot-Blot sehr ausgeprägt erschienen, im anschließenden Western-Blot nur gering aus. Im Gegensatz dazu zeigte beispielsweise VGG12 im Dot-Blot nur ein schwaches Bindungssignal, im Western-Blot hingegen detektierte der Antikörper eindeutig das Zielprotein. Letztere Beobachtung könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass im Western-Blot generell die fünffache Menge des Rezeptorproteins vorlag. Insofern ist es wahrscheinlich, dass einige Antikörper mit der Fähigkeit, an das denaturierte hTSLP-Rezeptorprotein zu binden, letztlich mit dieser Methode nicht identifiziert wurden. Zu den ausgeschlossenen Antikörpern zählten beispielsweise auch die später als Inhibitoren charakterisierten Antikörper 1E10 und 6F4, welche in nachträglichen Untersuchungen schließlich doch an das denaturierte hTSLP-Rezeptorprotein banden (Daten nicht gezeigt, (Borowski et al. 2013)). Die Western-Blot-Detektion stellte sich trotz des höheren Arbeitsaufwandes als die effektivere Variante heraus. Durch den Einsatz von Hybridoma-Überständen wurden auf diese Weise VGG12 und D9C10 als potentielle Antikörper für die Erkennung des denaturierten Zielproteins identifiziert. Bei äquivalent eingesetzten Konzentrationen wies VGG12 im Unterschied zu D9C10 ein stärker ausgeprägtes Bindungssignal auf. Allerdings kam es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr zu einer Untersuchung der Detektionsgrenzen von VGG12 und einem Nachweis des natürlich exprimierten, denaturierten hTSLP-Rezeptors

durch eine Western-Blot-Analyse. Der Antikörper VGG12 zeigte von allen getesteten spezifischen anti-hTSLPR-Antikörpern auch bei der zytometrischen Detektion des hTSLP-Rezeptors an der Zelloberfläche von Ba/F3-hTSLPR-Zellen stets das beste Bindungssignal und war mit kommerziellen anti-hTSLPR-Antikörpern, welche erst nach Beginn dieses Projektes verfügbar wurden, vergleichbar. Darüber hinaus konnte sein Hybridomaklon unbegrenzt über mindestens ein Jahr und mit einer konstanten Antikörperproduktion kultiviert werden, was die Gewinnung präparativer Antikörpermengen ermöglichte.

Wie am Beispiel des Antikörpers VGG12 und anderer identifizierter anti-hTSLPR-Antikörper belegt werden konnte, ist die Hybridomatechnik eine leistungsfähige Methode, um hochspezifische monoklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen zu erhalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf diese Weise gewonnene Antikörper direkt für *in-vitro*-Analysen und die Detektion von Zielproteinen angewendet werden können. Der Erfolg der Hybridomatechnik beruht allerdings in hohem Maße auf dem Zufallsprinzip, da nicht immer jene B-Plasmazellen erfolgreich fusioniert werden, die eventuell die gewünschten Antikörper sezernieren. Trotz der Vorteile, die die Hybridomatechnik aufzeigt, ist sie vor allem aufgrund der Notwendigkeit von Subklonierungen und einer aufwendigen Durchmusterung von Hybridoma-Kulturüberständen sehr arbeitsintensiv und langwierig. Bislang gibt es einige Ansätze, die Hybridoma-Zellisolation zu rationalisieren. Beispielsweise ermöglicht die sogenannte *Magnetic cell sorting* (MACS)-Technologie die Separierung hoch produzierender Hybridomaklone anhand einer Markierung mit magnetischen Beads (Hoch et al. 2006). Darüber hinaus bildet die Antigen-spezifische Selektion von Hybridomas mithilfe der *Fluorescence-activated cell sorter* (FACS)-Analyse (Parks et al. 1979) die Grundlage für gegenwärtig erprobte Selektionsverfahren. Gegenüber der Hybridomatechnik gewinnt die Erzeugung rekombinanter, gänzlich humaner Antikörper beispielsweise durch die *Phagen-Display*-Technik, die *Xeno-Mouse*-Technologie oder unsterbliche B-Zellen zunehmend an Bedeutung und könnte in naher Zukunft die herkömmliche Hybridomatechnik ablösen (Wohlgemuth und Li 2012).

Ein weiteres Ziel stellte die Detektion des natürlich exprimierten hTSLP-Rezeptors humaner Zellen durch den Einsatz gewonnener anti-hTSLPR-Antikörper dar. Park et al. (2000) und Zhang et al. (2001) postulierten anhand des Nachweises einer Expression des hTSLP-Rezeptors auf mRNA-Ebene eine Oberflächenpräsentation des Rezeptors auf Monozyten und B-Lymphozyten (Park et al. 2000, Zhang et al. 2001), welche bis vor kurzem noch nicht belegt war. Angesichts dessen und aufgrund der einfachen Verfügbarkeit humaner Blutzellen und des uneingeschränkten Zugriffs auf den monoklonalen Antikörper VGG12 wurden die genannten Zellen mittels zytometrischer Analysen bezüglich einer Expression des hTSLP-Rezeptors auf Protein-Ebene untersucht. Die Isolation peripherer

mononukleärer Zellen (PBMCs) erfolgte aus Vollblutkonserven gesunder Spender. Die prozentualen Anteile der Monozyten in Bezug auf die PBMC-Gesamtpopulation schwankten spenderabhängig ($n = 5$) zwischen 4,6 – 11 %, die der B-Zellen zwischen 6 – 10 %, wobei sich die Ergebnisse mit den Angaben aus der Literatur decken. Der Monozytenanteil scheint interindividuell generell starken Schwankungen zu unterliegen. Gemäß den Untersuchungen zur quantitativen Zusammensetzung von PBMCs durch Leidig (2010) werden Anteile der CD14⁺ Monozyten von $16,8 \pm 11,6$ % beschrieben. Die Angaben zu CD19⁺ B-Lymphozyten mit einem Anteil von $8,6 \pm 2,2$ % (Leidig 2010) stimmen ebenfalls mit den eigenen Beobachtungen überein. Da der Einsatz eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers an PBMCs unspezifische Bindungssignale hervorrief und um eine potenzielle Bindungsspezifität des monoklonalen Antikörpers zu erreichen, wurde VGG12 zunächst direkt an FITC konjugiert und in dieser Form für weitere zytometrische Analysen von PBMCs eingesetzt. Sofern die Inkubation mit VGG12 und die Analyse direkt nach der Zellisolierung bzw. nach dem Auftauen kryokonservierter PBMCs vorgenommen wurde, konnte kein Nachweis des hTSLPR-Rezeptors erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise gelang die Detektion des Rezeptors erst nach einer Kultivierung der PBMCs für 12 – 24 h unter Standardbedingungen in RFG-Medium. Bezüglich der Monozyten wurde eine Population detektiert, welche sowohl CD14⁺ als auch hTSLPR⁺ war und einen Anteil von 3 – 4 % der PBMC-Gesamtpopulation ausmachte. Das bedeutet, dass beinahe alle Monozyten in Kultur dazu angeregt worden waren, den Rezeptor zu präsentieren. Während diese Untersuchungen im Gange waren, veröffentlichten Hirano et al. (2011) ihre Beobachtungen hinsichtlich einer hTSLP-Rezeptorexpression durch Monozyten. Die Arbeitsgruppe konnte ebenfalls durch zytometrische Analysen eine Oberflächenexpression des Rezeptors auf niedrigem Niveau nachweisen (Hirano et al. 2011). Der hierfür eingesetzte Antikörper war ein mittlerweile erhältlich gewordener kommerzieller anti-hTSLPR-Antikörper. Hirano et al. (2011) zufolge wird die hTSLP-Rezeptorexpression bei Monozyten durch eine Stimulation mit humanem TSLP nicht gesteigert. Bei den eigenen Untersuchungen konnte durch hTSLP ebenfalls keine Zunahme der Rezeptordichte an der Zelloberfläche von Monozyten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) hingegen scheint bei Monozyten eine Hochregulation des Rezeptors zu bewirken (Zhang et al. 2001). LPS sind natürliche Komponenten der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und potente Auslöser von Immunreaktionen mit massiver Ausschüttung von Zytokinen wie TNF α , IL-1 β und IL-6 (Andersson et al. 1992, Rivest et al. 2000). Scheinbar induzieren LPS auch die Freisetzung des Zytokins TSLP durch Monozyten und dendritische Zellen (Kashyap et al. 2011). Unter dem Gesichtspunkt, dass die TSLP-vermittelte Immunantwort vor allem in Geweben

mit einem Barrieredefekt zu beobachten ist, welche Eintrittspforten für Pathoorganismen, Allergene und Chemikalien bieten (Oyoshi et al. 2009, Demehri et al. 2009), ist eine gesteigerte Expression und Präsentation des hTSLP-Rezeptors durch Monozyten und die Produktion von TSLP in Reaktion auf externe Stimuli, wie gramnegative Erreger, durchaus vorstellbar. Bei der PBMC-Isolation und während der Kultivierung dieser Zellen kann ein Kontakt zu solchen externen Stimuli nicht ausgeschlossen werden. Neben LPS könnte auch das zu 10 % im Medium enthaltene fetale Kälberserum (FCS), das neben einer Vielzahl an Proteinen auch teilweise Verunreinigungen enthält, für die Auslösung der zellulären Reaktionen und damit einer Expression des Rezeptors durch Monozyten verantwortlich sein. Auch Hirano et al. (2011) setzten für die Kultivierung der PBMCs 10 % FCS ein. In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch etwa ein Drittel aller B-Lymphozyten, die zuvor zusammen mit den anderen peripheren mononukleären Zellen kultiviert worden waren, den hTSLP-Rezeptor exprimierten. Möglicherweise führte auch bei den B-Zellen eine Medium-induzierte Reaktionskaskade unter Kulturbedingungen zu einer Initiierung der Expression des Rezeptors. Wie mehrfach berichtet wurde, können Medium-Komponenten wie FCS in Lymphozyten durchaus unspezifische Reaktionen hervorrufen (Johnson und Russell 1965, Zielske und Golub 1976). Die zytometrisch identifizierten hTSLPR⁺ B-Zellen machten einen Anteil von etwa 3 % der PBMC-Gesamtpopulation aus. Interessanterweise schien bei diesem B-Zell-Anteil gleichzeitig die Expression des Oberflächenproteins CD19 herunter reguliert zu sein. Die schwache CD19-Oberflächenexpression bei hTSLPR⁺ B-Zellen bildete den Kontrast zu einer ausgeprägten CD19-Expression, wie sie bei über 90 % der frisch isolierten B-Lymphozyten vor einer Kultivierung zu beobachten war. Das Oberflächenantigen CD19 ist ein typischer Biomarker reifer B-Zellen. Die Oberflächendichte des exprimierten Transmembranproteins wird im Verlauf der B-Zellentwicklung reguliert und variiert in Abhängigkeit vom Reifungsstadium. Während der terminalen Differenzierung zu Plasmazellen nimmt die CD19-Dichte wieder ab (Haas und Tedder 2005, Wang et al. 2012). Möglicherweise könnte eine Expression des hTSLP-Rezeptors in Zusammenhang mit einer Herunterregulierung des CD19-Oberflächenrezeptors bei der Entwicklung zur IgE-produzierenden Plasmazelle nach Antigenkontakt stehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Monozyten und B-Lymphozyten den humanen TSLP-Rezeptor *in-vitro* unter bestimmten Bedingungen exprimieren und auf der Zelloberfläche präsentieren. Der anti-hTSLPR-Antikörper VGG12 hat sich als spezifischer Oberflächenbinder erwiesen, welcher in der Lage ist, neben der rekombinanten Variante auch den natürlich exprimierten hTSLP-Rezeptor auf humanen Zellen zu detektieren.

Ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen wurden im zweiten Teil des Projektes humane B-ALL-Zelllinien mithilfe monoklonaler anti-hTSLPR-Antikörper bezüglich einer Oberflächenexpression des humanen TSLP-Rezeptors durchgemustert. Erst seit kurzem ist bekannt, dass der Rezeptor bei etwa 15 % der Patienten mit einer B-ALL in überexprimierter Form vorliegt und womöglich für den ungünstigen Verlauf dieser Erkrankung von funktioneller Bedeutung ist (Yoda et al. 2010). Die B-ALL, eine Unterform der Leukämie, weist eine erhebliche Heterogenität auf. Diese kann durch die bisher entwickelten *in-vitro*-Modelle nicht gänzlich erfasst werden. Seit langem wird nach einer Möglichkeit der Langzeitkultivierung direkt isolierter B-ALL-Zellen geforscht, um *in-vitro* das Ansprechen auf Chemotherapeutika vor der Einleitung einer definitiven Therapie im Sinne der Individualmedizin ermitteln zu können. Versuche, primäre ALL-Zellen in herkömmlichem Medium zu kultivieren, führten zumeist zur Apoptose (Brown et al. 2008). Eine Koinkubation leukämischer Zellen mit Knochenmark-Stromazellen konnte hingegen die Apoptoserate mindern und die Proliferation fördern (Bradstock et al. 1996). Dieses Verfahren hat sich allerdings nicht bewährt, da leukämische Zellen anscheinend durch eine Interaktion mit den Stromazellen moduliert werden und schließlich *in-vitro* weniger empfindlich auf Chemotherapeutika reagieren (Mudry et al. 2000, Meads et al. 2008). Unlängst stellten Nijmeijer et al. (2009) eine Methode der Langzeitkultivierung primärer humaner lymphoblastischer Leukämiezellen durch die Verwendung serum- und wachstumsfaktorfreien Mediums vor. Dadurch gelang die Kultivierung von 12 aus 34 Patientenproben für mindestens 1 Jahr (Nijmeijer et al. 2009). In Zusammenarbeit mit PD Dr. O. G. Ottmann und Susanne Badura, Institut für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums der Goethe-Universität Frankfurt, wurden in diesem Projekt 10 der 12 vorgestellten kultivierbaren humanen B-ALL-Zelllinien bezüglich einer hTSLP-Rezeptorexpression untersucht. Für die zytometrische Durchmusterung wurde der anti-hTSLPR-Antikörper VGG12 verwendet, welcher bereits erfolgreich zur Detektion des exprimierten hTSLP-Rezeptors primärer Blutzellen eingesetzt worden war. Aufgrund der Tatsache, dass ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper in Vorversuchen auf keiner dieser Zelllinien unspezifische Bindungen hervorrief, wurde VGG12 in unkonjugierter Form eingesetzt. Bei der Analyse zeigten die Zellen der Linie HP eine stark ausgeprägte, die der Linie CR eine schwächere hTSLP-Rezeptorpräsentation an der Zelloberfläche. Die Expression des Rezeptors wurde zusätzlich durch eine Western-Blot-Detektion durch den Einsatz des kommerziellen polyklonalen anti-hTSLPR-Antikörpers bestätigt. Eine Detektion durch den monoklonalen, ebenfalls für Western-Blot-Analysen geeigneten Antikörper VGG12 wäre ebenfalls interessant, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Ergebnisse erlauben trotz der geringen Probenanzahl eine grobe Abschätzung der Prävalenz einer hTSLPR-Expression bei

der B-ALL. Von den 10 untersuchten Zelllinien waren 20 % (2/10) hTSLPR⁺, 10 % (1/10) zeigten eine hTSLPR-Überexpression. Charakteristischerweise wiesen die hTSLPR⁺ Zelllinien nicht die sonst bei der B-ALL beobachteten typischen genetischen Aberrationen, wie t(9;22), t(1;19), t(11;19) oder *etv6-abl* auf, welche indessen bei den hTSLPR⁻ Zelllinien ermittelt wurden (Nijmeijer et al. 2009). Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Autoren (Yoda et al. 2010). Die primären Zellen der Linie HP zeigten zu Beginn der Kultivierung den Karyotyp 47,XX,+i(21) (Nijmeijer et al. 2009). Wie berichtet wird, geht eine Trisomie des Chromosoms 21 (Hsa21) im Zusammenhang mit dem Down-Syndrom relativ häufig mit der Entwicklung einer ALL einher (Malinge et al. 2009). Darüber hinaus tritt in 55 – 62 % der Down-Syndrom assoziierten ALL (DS-ALL) eine Überexpression des hTSLP-Rezeptors auf (Mullighan et al. 2009). Der Grund dafür ist noch weitestgehend unbekannt. Womöglich liegt die Ursache der gesteigerten Rezeptorexpression in einer veränderten Gendosis. Dieser Zusammenhang bedarf jedoch unbedingt weiteren Untersuchungen. Aufgrund dieser Beobachtungen ist es naheliegend zu spekulieren, dass die dysregulierte Expression des hTSLP-Rezeptors der Linie HP mit der Präsenz eines zusätzlichen Chromosoms 21 assoziiert sein könnte. Im Gegensatz dazu wies der Karyotyp der ebenfalls hTSLPR⁺ Linie CR keine Trisomie des Chromosoms 21 auf, allerdings war die Rezeptorexpression dieser Zellen nur schwach ausgeprägt. Auch hier ist die Ursache für die hTSLPR-Expression nicht bekannt. Wie Nijmeijer et al. (2009) durch einen Vergleich der Karyotypen von primären B-ALL-Zellen und ihrer entsprechenden, für sechs Monate kultivierten Zelllinien zeigten, führte eine längerfristige Kultivierung von B-ALL-Zellen vermutlich durch eine klonale Evolution teilweise zu einem *Genshift*. Folglich wiesen manche Zelllinien im Gegensatz zu den primären Zellen zusätzliche Aberrationen und einen geringfügig veränderten Immunphänotyp auf, wie beispielsweise den Verlust des Oberflächenantigens CD34 in 6/7 Fällen. Die Linie HP zeigte beispielsweise nach sechs Monaten Kultivierung den veränderten Karyotyp 46,XX,del(13),der(16)t(13;16),i(21). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch während einer 12-monatigen Kultivierungszeit der Linien HP und CR keine Veränderung bezüglich der Ausprägung der hTSLPR-Expression beobachtet werden.

Da TSLP unter anderem bei der Regulation der normalen Lymphopoese eine Rolle spielt (Scheeren et al. 2010), lag die Vermutung nahe, dass das Zytokin auch das Überleben und die Proliferation der hTSLPR⁺ B-ALL-Zelllinien HP und CR fördern könnte. Wie berichtet wird und wie anhand eigener zytometrischer Analysen festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), exprimieren die meisten hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen, wie auch die Linien HP und CR, zusätzlich die hIL-7R α -Kette (Hertzberg et al. 2010). Aufgrund dieser Tatsache wurde angenommen, dass die Zellen theoretisch zur Bildung eines funktionellen

hTSLP-Rezeptors in der Lage sind. Eine Stimulation der hTSLPR⁺ B-ALL-Zelllinie HP mit hTSLP resultierte im Gegensatz zur hTSLPR⁺ Linie CR und zur hTSLPR⁻ Linie SK in einer dosisabhängigen Proliferationszunahme um maximal 60 %, ausgehend von der Basisproliferation. Zwar war dieser Effekt nicht sehr ausgeprägt, diese ersten Ergebnisse decken sich jedoch mit den Beobachtungen von Brown et al. (2007). Jene Arbeitsgruppe wies bei einer murinen B-ALL-Zelllinie nach einer Stimulation mit ähnlichen mTSLP-Konzentrationen ebenfalls einen Proliferationszuwachs um maximal 50 % nach. Andere Zelllinien zeigten hingegen in Reaktion auf mTSLP eine dreifach erhöhte Proliferationsrate (Brown et al. 2007). Neben den Untersuchungen bezüglich zellphysiologischer Parameter wurden in dieser Arbeit ansatzweise die biochemischen Auswirkungen einer Stimulation von hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen mit hTSLP erfasst. Im Zentrum der Analyse stand der Grad der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5. Wie einige Autoren berichten, scheinen phosphorylierte STATs, im Besonderen STAT5, an der TSLP-induzierten Signaltransduktion von B-ALL-Zellen beteiligt zu sein (Levin et al. 1999). In Reaktion auf eine Stimulation mit hTSLP war bei der Linie HP in einer Western-Blot-Detektion eine ausgeprägte Tyrosinphosphorylierung von STAT5 zu verzeichnen, was die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt (Brown et al. 2007). Die Ergebnisse zeigen, dass der in überexprimierter Form vorliegende humane TSLP-Rezeptor der B-ALL-Zelllinie HP in der Lage ist, Signale in den Zellkern weiterzuleiten. Reporterassays gaben außerdem Hinweise, dass neben STAT5 auch der Transkriptionsfaktor STAT1 an der Signaltransduktion der Linie HP in Reaktion auf hTSLP beteiligt sein könnte (Daten nicht gezeigt). Diese Hypothese sollte in nachfolgenden Arbeiten, beispielsweise anhand von Western-Blot-Detektionen, verifiziert werden.

Der Einsatz von Antikörpern in der Therapie von Krebserkrankungen gewinnt zunehmend an Bedeutung. Aufgrund der Rolle des hTSLP-Rezeptors bei malignen und allergischen Erkrankungen lag die Identifizierung eines Rezeptor-Antagonisten in Form eines inhibitorischen Antikörpers nahe, was ein weiteres Ziel dieser Arbeit darstellte. Die Verfügbarkeit eines hTSLPR-Antagonisten ist erfolgversprechend, wie bereits im murinen System anhand löslicher mTSLPR-Immunglobuline gezeigt werden konnte, welche die inflammatorische Reaktion in den oberen Atemwegen asthmatischer Mäuse zu beeinflussen vermochten (Zhang et al. 2011). Theoretisch betrachtet blockieren inhibitorische anti-hTSLPR-Antikörper durch ihre Bindung an die extrazelluläre Domäne der hTSLPR α -Kette die Bindungsstelle für hTSLP, sodass die Ketten-Dimerisierung mit der hIL-7R α -Untereinheit ausbleibt und in Ermangelung eines funktionstüchtigen Rezeptors in der Folge das entsprechende Signal nicht in den Zellkern weitergeleitet wird. Die mithilfe der Hybridomatechnik gewonnenen funktionellen, monoklonalen anti-hTSLPR-Antikörper wurden in Reporter-

genassays auf inhibitorische Eigenschaften getestet. Mit dieser Methode konnten die drei Antikörper 1E10, 1B11, 6F4 identifiziert werden, welche in gereinigter Form die hTSLP-abhängige Proliferation der stabilen Ba/F3-hTSLPR-Linie bei einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 0,6 μ M dosisabhängig hemmten. Mithilfe dieser antagonistischen Antikörper wurden ansatzweise die Auswirkungen einer Rezeptorinhibition auf zellphysiologische und biochemische Parameter in humanen B-ALL-Zellen mit einer hTSLPR-Überexpression untersucht. Bei der Zelllinie HP konnte in Vorversuchen durch den Inhibitor 1E10 eine maximale Proliferationshemmung um 70 % ermittelt werden. Diese entsprach in etwa der zuvor beobachteten Proliferationszunahme, wie sie durch eine Stimulation mit hTSLP erreicht wurde. Die IC_{50} von 1E10 lag bei diesem Test etwa zwischen 0,4 – 0,5 μ M und war mit der halbmaximalen Hemmung durch 1E10 bei Proliferationsinhibitionstests der Zelllinie Ba/F3-hTSLPR und mit der IC_{50} von therapeutischen Antikörpern, wie Trastuzumab, Cetuximab oder Bevacizumab (Nakamura et al. 2005, Bull Phelps et al. 2008, Yang et al. 2010), vergleichbar. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge, scheint somit der durch hTSLP ausgelöste Proliferationseffekt mittels hTSLPR-Antagonisten neutralisiert werden zu können. Die hTSLP-unabhängige Basisproliferation der maligne entarteten hTSLPR⁺ B-ALL-Zelllinie HP, welche auch unter Kulturbedingungen ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren zu beobachten ist, wird allerdings nicht gehemmt. Für Folgearbeiten wäre eine Bestimmung der Apoptose der hTSLPR⁺ B-ALL-Zelllinie HP durch eine zytometrische Detektion des Proteins Annexin V nach einer Behandlung mit inhibitorischen anti-hTSLPR-Antikörpern durchaus interessant. Des Weiteren wurde untersucht, ob die antagonistischen Antikörper die beobachtete hTSLP-induzierte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5 der hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen beeinflussen. In einer Western-Blot-Detektion konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor 1E10 die STAT5-Phosphorylierung der Linie HP bei einer Konzentration von 200 μ g/ml hemmte. Die gleiche Konzentration von 1E10 supprimierte auch in Ba/F3-hTSLPR-Zellen die hTSLP-induzierte STAT5-Phosphorylierung. Sofern das Zytokin hTSLP tatsächlich eine Auswirkung auf das Proliferationsverhalten von hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen hat, könnten hTSLPR-Antagonisten diese in ihren malignen Eigenschaften beeinflussen. Die gezeigten Experimente sind zu diesem Zeitpunkt allerdings nur als Vorversuche zu betrachten, da zur Verifizierung des Einflusses inhibitorischer anti-hTSLPR-Antikörper auf die Signalübertragung von hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen weitere Untersuchungen mit abgestuften Konzentrationen des Inhibitors 1E10 erforderlich sind und im Vergleich mit nicht-inhibitorischen anti-hTSLPR-Antikörpern ausgewertet werden müssen. Die Grundlage dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit geschaffen.

Ausgehend von den Ergebnissen eröffnet die Verfügbarkeit von hTSLPR-Antagonisten die Möglichkeit einer zielgerichteten therapeutischen Intervention bei Patienten mit einer hTSLPR⁺ B-ALL. Für den direkten therapeutischen Einsatz sind die aus Hybridomaklonen gewonnenen, monoklonalen Antikörper in dieser Form hingegen nicht geeignet, da murine Immunglobuline im menschlichen Organismus schwere anaphylaktische Reaktionen auslösen können und die Bildung von neutralisierenden humanen anti-Maus-Antikörpern (HAMA) induzieren (Schroff et al. 1985, Meeker et al. 1985). Um spezifische Antikörper therapeutisch einsetzen zu können, müssen sie zunächst humanisiert werden. Gegenwärtig ist die nahezu vollständige Humanisierung muriner Antikörper mittels rekombinanter Antikörpertechnologien ein Standardverfahren. Durch den Austausch konservierter Bereiche muriner Antikörper werden gut verträgliche Antikörper generiert und Antikörperbindungseigenschaften noch verbessert (Jones et al. 1986, Baca et al. 1997).

Die therapeutische Wirkung der entwickelten inhibitorischen anti-hTSLPR-Antikörper könnte aufgrund der Heterogenität der B-ALL mit einer hTSLPR-Überexpression abhängig von der vorliegenden genetischen Störung variieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt antagonistischer anti-hTSLPR-Antikörper ausschließlich an einer hTSLPR⁺ B-ALL-Zelllinie getestet, bei welcher jedoch die tatsächlich zugrunde liegende Ursache für die hTSLPR-Überexpression nicht bekannt war. Aus diesem Grund könnten in Folgearbeiten verschiedene B-ALL-Zelllinien mit einer hTSLPR-Überexpression anhand ihrer genetischen Ursache in Subtypen klassifiziert und die Wirkung der Inhibitoren separat für jede Gruppe beurteilt werden. In der Einleitung wurden bereits die zurzeit bekannten genetischen Aberrationen der B-ALL mit einer hTSLPR-Überexpression vorgestellt. Potentiell könnten hTSLPR-Antagonisten an B-ALL-Zellen mit der CRLF2-Sequenz-Mutation Phe232Cys (Yoda et al. 2010) und solchen mit genetischen Aberrationen im CRLF2-Locus, wie der intrachromosomalen Deletion (P2RY8-CRLF2) oder der IGH[®]-CRLF2-Translokation (Russell et al. 2009), eine hemmende Wirkung erzielen. Im Gegensatz dazu ist es fraglich, ob der Einsatz eines hTSLPR-Antagonisten bei einer Präsenz der JAK2R683-Mutation einen hemmenden Effekt herbeiführen würde, da die mutierte JAK2 in Kombination mit der hTSLPR-Kette ein hTSLP-unabhängiges Wachstum und eine konstitutive Aktivierung des JAK-STAT-Weges bedingt (Bercovich et al. 2008, Russell et al. 2009). Wie am Beispiel des Rezeptors für *Epidermal growth factor* (EGF) beim Colonkarzinom mit einer *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*k-ras*)-Mutation beobachtet wird, führt der Einsatz von Rezeptor-Antagonisten, wie Cetuximab, nicht zu den gewünschten therapeutischen Effekten, da das mutierte K-RAS-Protein eine konstitutive Aktivierung der malignen Zellen hervorruft, die gänzlich vom EGF-Rezeptor und seinem Wachstumsfaktor entkoppelt ist. Der *k-ras*-Status dient heute als Prädik-

tor für das Ansprechen auf Cetuximab (Jiang et al. 2010). So könnte gegebenenfalls auch der JAK2-Status als Biomarker dienen, um die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens inhibierender monoklonaler anti-hTSLPR-Antikörper bei der hTSLPR⁺ B-ALL zu prognostizieren. Eine andere Mutation der JAK2, welche vor allem bei chronisch myeloproliferativen Erkrankungen wie der Polycythaemia vera (PV) vorkommt, ist die JAK2V617F-Aberration. Diese führt ebenfalls in Kombination mit einem Typ-I Rezeptor, wie dem Erythropoietin-Rezeptor (EpoR), zu einer konstitutiven Aktivierung des JAK-STAT-Weges und einer faktorunabhängigen Proliferation (Lu et al. 2005). Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass eine Mutation der JAK2 in verschiedenen Zellarten in ähnlicher Art und Weise Störungen der Signaltransduktion hervorrufen kann. Die aktivierende somatische Mutation der hIL-7R α -Kette (IL-7RS185C), welche in ca. 6 % der hTSLPR⁺ B-ALL nachgewiesen wurde, ist ebenfalls mit einer Überexpression der hTSLPR α -Kette assoziiert, wobei der Grund dafür noch nicht bekannt ist (Shochat et al. 2011). Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde die IL-7RS185C-Mutation in einem Expressionssystem rekonstituiert und die hIL-7R α S185C-Kette in Kombination mit der hTSLPR α -Kette in Ba/F3-Zellen transfiziert. Untersuchungen bezüglich der Fragestellung, ob die zytokinunabhängige Aktivierung durch den Einsatz inhibitorischer anti-hTSLPR-Antikörper gehemmt werden könne, resultierte überraschenderweise in einer zusätzlich gesteigerten Rezeptor-Aktivierung (Borowski 2012). Die Ursache dafür konnte bislang noch nicht gefunden werden. Eine unspezifische Antikörperbindung an die mutierte hIL-7R α S185C-Kette wurde ausgeschlossen.

Einige Patienten mit hämatologischen Erkrankungen einschließlich der ALL weisen eine sogenannte *mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Dysregulation auf. mTOR sind Serin/Threonin-Kinasen, welche die Proteinsynthese, den Zellzyklus und das Zellwachstum regulieren (Teachey et al. 2009). Der Grund für die fehlgeleitete Aktivität der mTOR scheint unter anderem in einer Überexpression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu liegen (Brown et al. 2007). Aufgrund dessen wäre es interessant festzustellen, ob die Überexpression des hTSLP-Rezeptors bei der B-ALL zu einer solchen mTOR-Dysregulation beiträgt. In diesem Zusammenhang untersuchten Brown et al. (2007) die Wirkung von mTOR-Inhibitoren (MTI) auf murine und humane B-ALL-Zellen. Der MTI Rapamycin entfaltete zwar eine hemmende Wirkung auf die Proliferation und die Proteinsynthese von B-ALL-Zellen und induzierte sogar Apoptose. Diese Effekte wurden jedoch unter anderem durch eine Stimulation mit TSLP aufgehoben. Es stellt sich die Frage, ob inhibitorische anti-hTSLPR-Antikörper, wie 1E10, die Empfindlichkeit von humanen B-ALL-Zellen gegenüber mTOR-Inhibitoren erhöhen. Dies könnte beispielsweise durch eine Messung der Apoptose mittels Annexin V eruiert werden. Bei einem erhöhten Ansprechen der Krebszellen auf MTI könnten diese neben inhibitorischen anti-hTSLPR-Antikörpern als

weitere Therapieoption bei der hTSLPR⁺ B-ALL in Frage kommen (Brown et al. 2003).

Das in diesem Projekt angestrebte Ziel, den hTSLP-Rezeptor auf der Oberfläche von B-ALL-Zellen durch den Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper im Durchflusszytometer nachzuweisen, konnte mithilfe des anti-hTSLPR-Antikörpers VGG12 erreicht werden. Die Ergebnisse bestätigten, dass VGG12 als Werkzeug zur Detektion des potentiell krankheitsrelevanten Rezeptors auf Blutzellen geeignet ist. In der Praxis könnte VGG12 künftig für das Screening von Patientenmaterial auf eine Überexpression des hTSLP-Rezeptors verwendet werden. Darüber hinaus stellt der Einsatz monoklonaler inhibitorischer anti-hTSLPR-Antikörper eine therapeutische Möglichkeit dar, sowohl hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen in ihren malignen Eigenschaften zu beeinflussen als auch hTSLP-getriggerte Immunprozesse bei allergischen Erkrankungen zu limitieren. Weitere Untersuchungen sind dazu erforderlich.

7 Schlussfolgerungen

Mithilfe der Hybridomatechnik konnten monoklonale anti-hTSLPR-Antikörper gewonnen werden, welche als Werkzeug zum Nachweis des humanen TSLP-Rezeptors sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in Western-Blot-Detektionen geeignet sind. Mit der Verfügbarkeit funktioneller anti-hTSLPR-Antikörper eröffnen sich zahlreiche Forschungsperspektiven, sowohl bei der Untersuchung der B-ALL mit einer hTSLP-Rezeptorüberexpression als auch bei der Betrachtung anderer Tumorerkrankungen, wie Brustkrebs oder Pankreaskrebs, bei welchen die Bedeutung von TSLP und seines Rezeptors derzeit noch unklar sind. Auch immunologische Prozesse und die Expression des hTSLP-Rezeptors durch Immunzellen können mithilfe der monoklonalen Antikörper bewertet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass durch den Einsatz inhibitorischer anti-hTSLPR-Antikörper möglicherweise die Wirkung des Zytokins hTSLP auf hTSLPR⁺ B-ALL antagonisiert werden kann. Inwieweit hTSLPR⁺ B-ALL-Zellen tatsächlich durch hTSLPR-Antagonisten in ihren malignen Eigenschaften beeinflussbar sind, gilt es in Folgearbeiten zu verifizieren und zu präzisieren. Da die zielgerichtete Therapie bei Krebserkrankungen einen immer höheren Stellenwert einnimmt, wäre es denkbar, dass betroffene Patienten routinemäßig zytometrisch und molekularbiologisch bezüglich einer hTSLPR-Expression durchgemustert werden. Beim Nachweis einer hTSLP-Rezeptorüberexpression könnten solche Patienten in naher Zukunft möglicherweise einer systemischen Therapie mit humanisierten monoklonalen anti-hTSLPR-Immunglobulinen zugeführt werden.

Literaturverzeichnis

- Andersson J, Nagy S, Björk L, Abrams J, Holm S, Andersson U. 1992. Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. *Immunol Rev*, 127:69–96.
- Baca M, Presta LG, O'Connor SJ, Wells JA. 1997. Antibody humanization using monovalent phage display. *J Biol Chem*, 272(16):10678–10684.
- Becker N, Holzmeier S. 2010. Die 20 häufigsten Krebstodesursachen in Deutschland im Jahr 2010 (aktualisierte Graphik). Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg.
- Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, Wainreb G, Birger Y, Elimelech A, Shochat C, Cazzaniga G, Biondi A, Basso G, Cario G, Schrappe M, Stanulla M, Strehl S, Haas OA, Mann G, Binder V, Borkhardt A, Kempinski H, Trka J, Biłorek B, Avigad S, Stark B, Smith O, Dastugue N, Bourquin JP, Tal NB, Green AR, Izraeli S. 2008. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet*, 372(9648):1484–1492.
- Borowski A. 2012. Untersuchungen zu IL-13- und TSLP-vermittelten Effekten im Asthma bronchiale - Entwicklung und Anwendung neuer TSLP-Rezeptorinhibitoren [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Borowski A, Vetter T, Kuepper M, Wohlmann A, Krause S, Lorenzen T, Virchow JC, Luttmann W, Friedrich K. 2013. Expression analysis and specific blockade of the receptor for human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) by novel antibodies to the human TSLPRa receptor chain. *Cytokine*, 61(2):546–555.
- Both L, Banyard AC, van Dolleweerd C, Horton DL, Ma JKC, Fooks AR. 2012. Passive immunity in the prevention of rabies. *Lancet Infect Dis*, 12(5):397–407.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.
- Bradstock K, Bianchi A, Makrynika V, Filshie R, Gottlieb D. 1996. Long-term survival and proliferation of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells on human bone marrow stroma. *Leukemia*, 10(5):813–820.
- Brown VI, Fang J, Alcorn K, Barr R, Kim JM, Wasserman R, Grupp SA. 2003. Rapamycin is active against B-precursor leukemia in vitro and in vivo, an effect that is modulated by IL-7-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25):15113–15118.

- Brown VI, Hulitt J, Fish J, Sheen C, Bruno M, Xu Q, Carroll M, Fang J, Teachey D, Grupp SA. 2007. Thymic stromal-derived lymphopoietin induces proliferation of pre-B leukemia and antagonizes mTOR inhibitors, suggesting a role for interleukin-7/Ralpha signaling. *Cancer Res*, 67(20):9963–9970.
- Brown VI, Seif AE, Reid GSD, Teachey DT, Grupp SA. 2008. Novel molecular and cellular therapeutic targets in acute lymphoblastic leukemia and lymphoproliferative disease. *Immunol Res*, 42(1-3):84–105.
- Bull Phelps SL, Schorge JO, Peyton MJ, Shigematsu H, Xiang LL, Miller DS, Lea JS. 2008. Implications of EGFR inhibition in ovarian cancer cell proliferation. *Gynecol Oncol*, 109(3):411–417.
- Cario G, Zimmermann M, Romey R, Gesk S, Vater I, Harbott J, Schrauder A, Moericke A, Izraeli S, Akasaka T, Dyer MJS, Siebert R, Schrappe M, Stanullas M. 2010. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood*, 115(26):5393–5397.
- Ceran C, Cokol M, Cingoz S, Tasan I, Ozturk M, Yagci T. 2012. Novel anti-HER2 monoclonal antibodies: synergy and antagonism with tumor necrosis factor-alpha. *BMC Cancer*, 12(1):450.
- Chapiro E, Russell L, Lainey E, Kaltenbach S, Ragu C, Della-Valle V, Hanssens K, Macintyre EA, Radford-Weiss I, Delabesse E, Cavé H, Mercher T, Harrison CJ, Nguyen-Khac F, Dubreuil P, Bernard OA. 2010. Activating mutation in the TSLPR gene in B-cell precursor lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 24(3):642–645.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 6(4):443–446.
- Cragg MS, French RR, Glennie MJ. 1999. Signaling antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol*, 11(5):541–547.
- De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, Braga M, Di Carlo V, Doglioni C, Protti MP. 2011. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med*, 208(3):469–478.
- Demehri S, Morimoto M, Holtzman MJ, Kopan R. 2009. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. *PLoS Biol*, 7(5):e1000067.

- van Dijk MA, van de Winkel JG. 2001. Human antibodies as next generation therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 5(4):368–374.
- Ensor HM, Schwab C, Russell LJ, Richards SM, Morrison H, Masic D, Jones L, Kinsey SE, Vora AJ, Mitchell CD, Harrison CJ, Moorman AV. 2011. Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from the MRC ALL97 clinical trial. *Blood*, 117(7):2129–2136.
- Feuring-Buske M, Hiddemann W, Buske C. 2002. Pathogenese und Biologie der Leukämien. *Der Internist*, 43:1179–1189.
- Flaquer A, Rappold GA, Wienker TF, Fischer C. 2008. The human pseudoautosomal regions: a review for genetic epidemiologists. *Eur J Hum Genet*, 16(7):771–779.
- Friend SL, Hosier S, Nelson A, Foxworthe D, Williams DE, Farr A. 1994. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol*, 22(3):321–328.
- Fujiwara SI, Yamashita Y, Choi YL, Watanabe H, Kurashina K, Soda M, Enomoto M, Hatanaka H, Takada S, Ozawa K, Mano H. 2007. Transforming activity of purinergic receptor P2Y₈, G protein coupled, revealed by retroviral expression screening. *Leuk Lymphoma*, 48(5):978–986.
- Garbe C, Adler G, Beckmann MW, Bootz F, Creutzig U, Feyer P, Howaldt HP, Jakse G, Kloke M, Kreienberg R, Schmiegel W. 2008. Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2008: Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen. sechste Aufl. München: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, 263–275.
- Goodlad JR, Batstone PJ, Hamilton DA, Kernohan NM, Levison DA, White JM. 2006. BCL2 gene abnormalities define distinct clinical subsets of follicular lymphoma. *Histopathology*, 49(3):229–241.
- Greaves M. 2002. Childhood leukaemia. *BMJ*, 324(7332):283–287.
- Gura T. 2002. Magic bullets hit the target. *Nature*, 417:584–586.
- Haas KM, Tedder TF. 2005. Role of the CD19 and CD21/35 receptor complex in innate immunity, host defense and autoimmunity. *Adv Exp Med Biol*, 560:125–139.
- Harari PM, Huang SM. 2001. Head and neck cancer as a clinical model for molecular targeting of therapy: combining EGFR blockade with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 49(2):427–433.

- Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, Wharton W, Mikhail FM, Carroll AJ, Kang H, Liu W, Dobbin KK, Smith MA, Carroll WL, Devidas M, Bowman WP, Camitta BM, Reaman GH, Hunger SP, Downing JR, Willman CL. 2010. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 115(26):5312–5321.
- He R, Geha RS. 2010. Thymic stromal lymphopoietin. *Ann N Y Acad Sci*, 1183:13–24.
- He R, Oyoshi MK, Garibyan L, Kumar L, Ziegler SF, Geha RS. 2008. TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(33):11875–11880.
- Heim MH. 1999. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res*, 19(1-4):75–120.
- Herold G. 2010. *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold, 85–97.
- Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I, Cazzaniga G, Schmitz M, Chalker J, Shiloh R, Iacobucci I, Shochat C, Zeligson S, Cario G, Stanulla M, Strehl S, Russell LJ, Harrison CJ, Bornhauser B, Yoda A, Rechavi G, Bercovich D, Borkhardt A, Kempf H, te Kronnie G, Bourquin JP, Domany E, Izraeli S. 2010. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. *Blood*, 115(5):1006–1017.
- Hirano R, Hasegawa S, Hashimoto K, Haneda Y, Ohsaki A, Ichiyama T. 2011. Human thymic stromal lymphopoietin enhances expression of CD80 in human CD14+ monocytes/macrophages. *Inflamm Res*, 60(6):605–610.
- Hoch A, Zörner K, Kattenbach S, Schneider E. 2006. Enrichment of High Producing Hybridoma using Magnetic Cell Sorting (MACS™). *Chemie Ingenieur Technik*, 78(9).
- Hsu WL, Preston DL, Soda M, Sugiyama H, Funamoto S, Kodama K, Kimura A, Kamada N, Dohy H, Tomonaga M, Iwanaga M, Miyazaki Y, Cullings HM, Suyama A, Ozasa K, Shore RE, Mabuchi K. 2013. The incidence of leukemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950-2001. *Radiat Res*, 179(3):361–382.
- Hudson PJ. 2000. Recombinant antibodies: a novel approach to cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(6):1231–1242.
- Imai K, Takaoka A. 2006. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer.

- Nat Rev Cancer, 6(9):714–727.
- Ito T, Liu YJ, Arima K. 2012. Cellular and Molecular Mechanisms of TSLP Function in Human Allergic Disorders - TSLP Programs the TTh2 code in Dendritic Cells. *Allergol Int*, 61(1):35–43.
- Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, Qin FFX, Yao Z, Cao W, Liu YJ. 2005. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med*, 202(9):1213–1223.
- Jiang Y, Mackley H, Cheng H, Ajani JA. 2010. Use of K-Ras as a predictive biomarker for selecting anti-EGF receptor/pathway treatment. *Biomark Med*, 4(4):535–541.
- Johnson GJ, Russell PS. 1965. Reaction of human lymphocytes in culture to components of the medium. *Nature*, 208(5008):343–345.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069):522–525.
- Junghans RP. 1997. Finally! The Brambell receptor (FcRB). Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. *Immunol Res*, 16(1):29–57.
- Karasuyama H, Melchers F. 1988. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol*, 18(1):97–104.
- Kashyap M, Rochman Y, Spolski R, Samsel L, Leonard WJ. 2011. Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells. *J Immunol*, 187(3):1207–1211.
- Kearney L, Castro DGD, Yeung J, Procter J, Horsley SW, Eguchi-Ishimae M, Bateman CM, Anderson K, Chaplin T, Young BD, Harrison CJ, Kempinski H, So CWE, Ford AM, Greaves M. 2009. Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 113(3):646–648.
- Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–497.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285(1-2):1–24.
- Krauss J. 2003. Recombinant antibodies for the diagnosis and treatment of cancer. *Mol Biotechnol*, 25(1):1–17.

- Kreis TE. 1986. Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO J*, 5(5):931–941.
- Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. 2003. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med*, 138(10):819–830.
- Lang S, Thompson J. 2006. Genetische Immunisierung – ein hocheffizientes Verfahren zur Antikörper-Herstellung für die medizinische Diagnostik und Therapie, Methoden. *BIOspektrum*, Sonderausgabe Proteomics & Drug Development:514–515.
- Leidig T. 2010. Entwicklung eines pharmakologischen Modells zur Prüfung immuntherapeutischer Antikörper mit dreidimensionalen Tumorzellkulturen in vitro [Dissertation]. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität.
- Levin SD, Koelling RM, Friend SL, Isaksen DE, Ziegler SF, Perlmutter RM, Farr AG. 1999. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J Immunol*, 162(2):677–683.
- Liu YJ. 2006. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med*, 203(2):269–273.
- Liu-Dumlao T, Kantarjian H, Thomas DA, O'Brien S, Ravandi F. 2012. Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment options. *Curr Oncol Rep*, 14(5):387–394.
- Lohri A, Herrmann R. 2004. Zevalin®-Radioimmunotherapie (RIT) als neue Therapieoption beim follikulären B-Zell-Lymphom. *Schweizerisches Medizin-Forum*, 4:1145–1148.
- Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, Gilliland DG, Lodish H. 2005. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52):18962–18967.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. 2009. *Der Experimentator Immunologie*. Dritte Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Malinge S, Izraeli S, Crispino JD. 2009. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*, 113(12):2619–2628.
- Marculescu R, Vanura K, Montpellier B, Roulland S, Le T, Navarro JM, Jäger U, McBlane F, Nadel B. 2006. Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. *DNA Repair (Amst)*, 5(9-10):1246–1258.

- Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Kawasaki S, Tanioka H, Inatomi T, de Waal Malefyt R, Hamuro J, Kinoshita S, Murakami A. 2010. Functional role of thymic stromal lymphopoietin in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(1):151–155.
- Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. 2008. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res*, 14(9):2519–2526.
- Meeker TC, Lowder J, Maloney DG, Miller RA, Thielemans K, Warnke R, Levy R. 1985. A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy. *Blood*, 65(6):1349–1363.
- Milne CD, Paige CJ. 2006. IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol*, 18(1):20–30.
- Miyata M, Hatsushika K, Ando T, Shimokawa N, Ohnuma Y, Katoh R, Suto H, Ogawa H, Masuyama K, Nakao A. 2008. Mast cell regulation of epithelial TSLP expression plays an important role in the development of allergic rhinitis. *Eur J Immunol*, 38(6):1487–1492.
- Mou Z, Xia J, Tan Y, Wang X, Zhang Y, Zhou B, Li H, Han D. 2009. Overexpression of thymic stromal lymphopoietin in allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol*, 129(3):297–301.
- Mudry RE, Fortney JE, York T, Hall BM, Gibson LF. 2000. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood*, 96(5):1926–1932.
- Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LAA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, Ma J, Coustan-Smith E, Harvey RC, Willman CL, Mikhail FM, Meyer J, Carroll AJ, Williams RT, Cheng J, Heerema NA, Basso G, Pession A, Pui CH, Raimondi SC, Hunger SP, Downing JR, Carroll WL, Rabin KR. 2009. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 41(11):1243–1246.
- Nakamura H, Takamori S, Fujii T, Ono M, Yamana H, Kuwano M, Shirouzu K. 2005. Cooperative cell-growth inhibition by combination treatment with ZD1839 (Iressa) and trastuzumab (Herceptin) in non-small-cell lung cancer. *Cancer Lett*, 230(1):33–46.
- Nijmeijer BA, Szuhai K, Goselink HM, van Schie MLJ, van der Burg M, de Jong D, Marijt EW, Ottmann OG, Willemze R, Falkenburg JHF. 2009. Long-term culture of primary human lymphoblastic leukemia cells in the absence of serum or hematopoietic growth factors. *Exp Hematol*, 37(3):376–385.
- Nowell PC. 2007. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J*

- Clin Invest, 117(8):2033–2035.
- Olkhanud PB, Rochman Y, Bodogai M, Malchinkhuu E, Wejksza K, Xu M, Gress RE, Hesdorffer C, Leonard WJ, Biragyn A. 2011. Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *J Immunol*, 186(10):5656–5662.
- Oyoshi MK, He R, Kumar L, Yoon J, Geha RS. 2009. Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis. *Adv Immunol*, 102:135–226.
- Palacios R, Steinmetz M. 1985. Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell*, 41(3):727–734.
- Park LS, Martin U, Garka K, Gliniak B, Santo JPD, Muller W, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA, Farr AG, Ziegler SF, Morrissey PJ, Paxton R, Sims JE. 2000. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med*, 192(5):659–670.
- Parks DR, Bryan VM, Oi VT, Herzenberg LA. 1979. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(4):1962–1966.
- Pegram MD, Lopez A, Konecny G, Slamon DJ. 2000. Trastuzumab and chemotherapeutics: drug interactions and synergies. *Semin Oncol*, 27(6 Suppl 11):21–5; discussion 92–100.
- Pellegrini S, Dusanter-Fourt I. 1997. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem*, 248(3):615–633.
- Promega. 2009. Technical Bulletin - CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay [Handbuch]. USA: Promega Corporation.
- Promega. 2012. Technical Bulletin - CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay [Handbuch]. USA: Promega Corporation.
- Pukac L, Kanakaraj P, Humphreys R, Alderson R, Bloom M, Sung C, Riccobene T, Johnson R, Fiscella M, Mahoney A, Carrell J, Boyd E, Yao XT, Zhang L, Zhong L, von Kerczek A, Shepard L, Vaughan T, Edwards B, Dobson C, Salcedo T, Albert V. 2005. HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer*, 92(8):1430–1441.
- Quentmeier H, Drexler HG, Fleckenstein D, Zaborski M, Armstrong A, Sims JE, Lyman

- SD. 2001. Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and signaling mechanisms leading to proliferation. *Leukemia*, 15(8):1286–1292.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. 2008. *Duale Reihe Biochemie*. Zweite Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 702–704.
- Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Mr L, Travis M, Zurawski SM, Johnston J, Liu YJ, Spits H, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Bazan JF. 2001. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol*, 167(1):336–343.
- Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. 2000. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*, 223(1):22–38.
- Roche. 2011. *Cytotoxicity Detection Kit (LDH) [Handbuch]*. Achte Aufl. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH.
- Rochman Y, Kashyap M, Robinson GW, Sakamoto K, Gomez-Rodriguez J, Wagner KU, Leonard WJ. 2010. Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(45):19455–19460.
- Russell LJ, Capasso M, Vater I, Akasaka T, Bernard OA, Calasanz MJ, Chandrasekaran T, Chapiro E, Gesk S, Griffiths M, Guttery DS, Haferlach C, Harder L, Heidenreich O, Irving J, Kearney L, Nguyen-Khac F, Machado L, Minto L, Majid A, Moorman AV, Morrison H, Rand V, Strefford JC, Schwab C, Tönnies H, Dyer MJS, Siebert R, Harrison CJ. 2009. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 114(13):2688–2698.
- Scheeren FA, van Lent AU, Nagasawa M, Weijer K, Spits H, Legrand N, Blom B. 2010. Thymic stromal lymphopoietin induces early human B-cell proliferation and differentiation. *Eur J Immunol*, 40(4):955–965.
- Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC. 1985. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*, 45(2):879–885.
- Sebastian K. 2008. *Funktionelle Rekonstitution des Thymic Stromal Lymphopoietin Rezeptors und Untersuchungen zu seiner Signaltransduktion [Diplomarbeit]*. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

- Sebastian K, Borowski A, Kuepper M, Friedrich K. 2008. Signal transduction around thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in atopic asthma. *Cell Commun Signal*, 6:5.
- Senn HJ, Drings P, Glaus A, Jungi WF, Pralle HB, Sauer R, Schlag PM. 2001. Checkliste Onkologie. Fünfte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 374–383.
- Sherrill JD, Gao PS, Stucke EM, Blanchard C, Collins MH, Putnam PE, Franciosi JP, Kushner JP, Abonia JP, Assa’ad AH, Kovacic MB, Biagini Myers JM, Bochner BS, He H, Hershey GK, Martin LJ, Rothenberg ME. 2010. Variants of thymic stromal lymphopoietin and its receptor associate with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*, 126(1):160–5.e3.
- Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, Cario G, Cazzaniga G, Kulozik AE, Stanulla M, Schrappe M, Biondi A, Basso G, Bercovich D, Muckenthaler MU, Izraeli S. 2011. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J Exp Med*, 208(5):901–908.
- Smith GP. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705):1315–1317.
- Smith SL. 1996. Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. *J Transpl Coord*, 6(3):109–19; quiz 120–1.
- Song X, Kim HC, Kim SY, Basse P, Park BH, Lee BC, Lee YJ. 2012. Hyperthermia-enhanced TRAIL- and mapatumumab-induced apoptotic death is mediated through mitochondria in human colon cancer cells. *J Cell Biochem*, 113(5):1547–1558.
- Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol*, 3(7):673–680.
- Storlazzi CT, Albano F, Cunsolo CL, Doglioni C, Guastadisegni MC, Impera L, Lonoce A, Funes S, Macrì E, Iuzzolino P, Panagopoulos I, Specchia G, Rocchi M. 2007. Upregulation of the SOX5 by promoter swapping with the P2RY8 gene in primary splenic follicular lymphoma. *Leukemia*, 21(10):2221–2225.
- Teachey DT, Grupp SA, Brown VI. 2009. Mammalian target of rapamycin inhibitors and their potential role in therapy in leukaemia and other haematological malignancies. *Br J Haematol*, 145(5):569–580.

- Tiensiwakul P. 2004. Cloning and sequencing of ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) variant in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 149(1):85–88.
- Tonozuka Y, Fujio K, Sugiyama T, Nosaka T, Hirai M, Kitamura T. 2001. Molecular cloning of a human novel type I cytokine receptor related to delta1/TSLPR. *Cytogenet Cell Genet*, 93(1-2):23–25.
- Vose JM, Link BK, Grossbard ML, Czuczman M, Grillo-Lopez A, Gilman P, Lowe A, Kunkel LA, Fisher RI. 2001. Phase II study of rituximab in combination with chop chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 19(2):389–397.
- Vosshenrich CAJ, Cumano A, Müller W, Di Santo JP, Vieira P. 2003. Thymic stromal-derived lymphopoietin distinguishes fetal from adult B cell development. *Nat Immunol*, 4(8):773–779.
- Wang K, Wei G, Liu D. 2012. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*, 1(1):36.
- Wild F. 2012. Monoklonale Antikörper als finanzielle Herausforderung für das Gesundheitswesen [Pressemitteilung]. Köln: Wissenschaftliches Institut der PKV (WIP).
- Wohlgemuth V, Li SM. 2012. Monoklonale Antikörper, die magischen Kugeln Paul Ehrlichs. *Apotheken-Magazin*, 30(3):7–14.
- Wohlmann A, Sebastian K, Borowski A, Krause S, Friedrich K. 2010. Signal transduction by the atopy-associated human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor depends on Janus kinase function. *Biol Chem*, 391(2-3):181–186.
- Wood KV, de Wet JR, Dewji N, DeLuca M. 1984. Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Commun*, 124(2):592–596.
- Yang H, Jager MJ, Grossniklaus HE. 2010. Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(6):2835–2842.
- Yoda A, Yoda Y, Chiaretti S, Bar-Natan M, Mani K, Rodig SJ, West N, Xiao Y, Brown JR, Mitsiades C, Sattler M, Kutok JL, DeAngelo DJ, Wadleigh M, Piciocchi A, Cin PD, Bradner JE, Griffin JD, Anderson KC, Stone RM, Ritz J, Foà R, Aster JC, Frank DA, Weinstock DM. 2010. Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(1):252–257.

- Yoo J, Omori M, Gyarmati D, Zhou B, Aye T, Brewer A, Comeau MR, Campbell DJ, Ziegler SF. 2005. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J Exp Med*, 202(4):541–549.
- Zhang F, Huang G, Hu B, Song Y, Shi Y. 2011. A soluble thymic stromal lymphopoietin (TSLP) antagonist, TSLPR-immunoglobulin, reduces the severity of allergic disease by regulating pulmonary dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 164(2):256–264.
- Zhang W, Wang J, Wang Q, Chen G, Zhang J, Chen T, Wan T, Zhang Y, Cao X. 2001. Identification of a novel type I cytokine receptor CRL2 preferentially expressed by human dendritic cells and activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 281(4):878–883.
- Ziegler SF. 2010. The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. *Curr Opin Immunol*, 22(6):795–799.
- Zielske JV, Golub SH. 1976. Fetal calf serum-induced blastogenic and cytotoxic responses of human lymphocytes. *Cancer Res*, 36(10):3842–3846.
- Zipursky A, Poon A, Doyle J. 1992. Leukemia in Down syndrome: a review. *Pediatr Hematol Oncol*, 9(2):139–149.

Anhang

Lebenslauf

persönliche Daten

Name	Tina Vetter
Geburtstag	28.08.1988
Geburtsort	Jena
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Anschrift	Sophienstraße 44, 07743 Jena
Telefon	0151 55547884
Email	tinavetter07646@hotmail.com

Bildung

1995 - 1999	Staatliche Grundschule Stadtroda
1999 - 2007	Staatliches Gymnasium Johann Heinrich Pestalozzi Stadtroda
06 / 2007	Abitur (Abschlussnote 1,2)
seit 10 / 2007	Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität, Jena (erwarteter Abschluss des Studiums: 10 / 2014)
09 / 2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Abschlussnote 1,5)

Praktika

07 / 2010 - 08 / 2010	Famulatur im Fachbereich Radiologie, Gemeinschaftspraxis Dr. med. M. Klinner, Jena
08 / 2012 - 09 / 2012	Famulatur im Fachbereich Neurologie, Ökumenisches Hainich Klinikum gGmbH, Mühlhausen (Thüringen)
09 / 2012 - 10 / 2012	Famulatur im Fachbereich Allgemeinmedizin, Gemeinschafts- praxis Dr. med. B. Plötner, Dr. med. C. Wanka, Bürgel
02 / 2013 - 03 / 2013	Famulatur im Fachbereich internistische Onkologie und Hämatologie, Zentralklinik Bad Berka
08 / 2013 - 12 / 2013	Erstes Tertial des Praktischen Jahres (PJ) im Fachbereich Neurologie, Universitätsklinikum Jena

Promotion

seit 09 / 2010	experimentelle Promotionsarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Karlheinz Friedrich, Institut für Biochemie II, Jena
08 / 2011	Zytometrische Experimente an humanen B-ALL-Zelllinien im Rahmen der Kollaboration mit Prof. Dr. Oliver G. Ottmann und Susanne Badura in der Goethe-Universität Frankfurt a. M.
11 / 2010 - 10 / 2011	Förderstipendium durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Veröffentlichungen**Publikation:**

Borowski A, Vetter T, Kuepper M, Wohlmann A, Krause S, Lorenzen T, Virchow JC, Luttmann W, Friedrich K. 2013. Expression analysis and specific blockade of the receptor for human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) by novel antibodies to the human TSLPR α receptor chain. Cytokine, 61(2):546–555.

Tagungsbeitrag:

Friedrich KH.1, Borowski A.1, Wohlmann A.1, Vetter T.1, Ranjan N.1, Luttmann W.3, Kuepper M.2. 2012. The Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) receptor in asthma and cancer: Influence on pathogenesis parameters and specific blockade by novel inhibitory antibodies [Vortrag und Abstract]. Signal Transduction Receptors, Mediators and Genes. 16. Meeting der Signal Transduction Society November 2012. Weimar: Leonardo Hotel.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Karlheinz Friedrich für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit unter seiner Leitung und innerhalb seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und für die allzeit engagierte Betreuung. Ich danke ihm dabei insbesondere für seine Unterstützung bei der Themenfindung und der Bewerbung für das IZKF-Förderstipendium sowie für die Anregungen, Hilfestellungen und konstruktiven Gespräche während des gesamten Entstehungsprozesses, für die Durchsicht der Arbeit und die Unterstützung bei der Veröffentlichung der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Andreas Borowski, der mich im Labor einarbeitete und als mein Betreuer in hohem Maße am Gelingen dieser Arbeit beteiligt war. Er war Fragen gegenüber immer aufgeschlossen, nahm sich stets meiner Probleme an und war häufig im rechten Moment ermutigend oder erheiternd.

Ich danke Prof. Dr. Otto W. Witte und den Mitgliedern des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) für das gewährte Förderstipendium.

Ich bedanke mich für die Kollaboration mit Dr. Michael Küpper, welcher die Immunisierungen und Fusionen vorgenommen hat.

Ich danke Dipl.-Biotechnol. Andreas Wohlmann für seine Hilfe in experimentellen Fragen, seine kreativen Ideen und Anregungen und seine Vorarbeiten im TSLP-Projekt, welche einen Ausgangspunkt für diese Arbeit darstellten.

Ich danke Prof. Dr. Oliver G. Ottmann und Susanne Badura von der Goethe-Universität Frankfurt am Main für die gute Zusammenarbeit, die Bereitstellung der B-ALL-Zelllinien und die stete Versorgung mit Kulturmedien, welche es mir ermöglicht haben, einen wesentlichen Teil dieser Arbeit bearbeiten zu können.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der Firma ImmunoTools GmbH, die mir stets Antikörper zur Verfügung stellte.

Ebenfalls bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Transfusionsmedizin der FSU Jena für die Bereitstellung der Vollblutkonserven.

Ich bedanke mich bei Dipl.-Biochem. Friedrich W. Uthe, der mich in das Verfahren der Durchflussszytometrie und die Grundlagen von *Latex* einwies.

Ich möchte mich des Weiteren bei Nadine Knutti, Susanne Jennek, Susanne Grimm und der gesamten Arbeitsgruppe ganz herzlich für die Unterstützung und die schöne Zeit im Labor bedanken. Bei Fragen, Problemen und zeitlichen Engpässen konnte ich stets auf Hilfe und Engagement zählen.

Ich bedanke mich bei Renate Schaper für die Durchsicht dieser Arbeit und die vielen wertvollen Hinweise.

Ich danke Dipl.-Inf. Ronny Degenhardt für seine unermüdliche Unterstützung bei der Arbeit mit *Latex*.

Ich danke ganz herzlich meinem Freund Michael Meents, der mich sowohl während der experimentellen Phase als auch während der Niederschrift dieser Arbeit unterstützte, mir auch in schwierigen Phasen zur Seite stand und mir immer wieder Mut zusprach.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Annekatrin und Jürgen Vetter und meiner Schwester Susanne Vetter. Sie nahmen sich stets meiner Sorgen und Probleme an, baten mir Zuflucht, wann immer ich eine Auszeit brauchte, und sorgten sich stets rührend um mein Wohlergehen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Karlheinz Friedrich (Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Tina Vetter